

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11) Publication number: **05112462 A**  
(43) Date of publication of application: **07.05.1993**

(51) Int. Cl **A61K 37/02**

**A61K 37/02, A61K 37/02, A61K 37/02, A61K 37/02, A61K 37/02, A61K 37/02**

(21) Application number: **03068640**

(22) Date of filing: **01.04.1991**

(30) Priority: **02.04.1990 US 90 502745**

**16.05.1990 US 90 524210**

**29.05.1990 US 90 530553**

(71) Applicant: **SYNERGEN INC**

(72) Inventor: **CARMICHAEL DAVID F**  
**SMITH CHRISTOPHER G**  
**ROBERT C THOMPSON**

(54) **TREATMENT OF INTERLEUKIN-1  
(IL-1)-MEDIATED DISEASE**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To provide a method for treating interleukin-1-mediated diseases, including arthritis, inflammatory bowel disease, septic shock, ischemia injury, and reperfusion injury.

**CONSTITUTION:** This method for treating interleukin-1 (IL-1)-mediated diseases comprises administering a therapeutically effective dose of an IL-1 inhibitor to a patient requiring the same. In a preferable embodiment, the interleukin-1 inhibitor is selected from IL-1raa, IL-1raB, IL-1rax and their combinations. The IL-1raa, the IL-1raB and the IL-1rax are preferably produced by recombination DNA technology.

**COPYRIGHT:** (C)1993,JPO

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-112462

(43)公開日 平成5年(1993)5月7日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 37/02	ABE	8314-4C		
	ABJ			
	ABN			
	ACD			
	ACJ			

審査請求 未請求 請求項の数27(全 26 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-68640

(22)出願日 平成3年(1991)4月1日

(31)優先権主張番号 07/502745

(32)優先日 1990年4月2日

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 07/524210

(32)優先日 1990年5月16日

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 07/530553

(32)優先日 1990年5月29日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 391022430

シナージエン, インコーポレーテッド  
SYNERGEN INCORPORATED

アメリカ合衆国 コロラド州 80301, ボ  
ウルダー, 33番ストリート 1885

(72)発明者 カーミカエル, デイヴィッド, エフ.

アメリカ合衆国 コロラド州 80027,

ルイスヴィル, サウス アダムズ ドライブ 300

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 インターロイキン-1により媒介された疾患の治療法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 インターロイキン-1により媒介された関節炎、インターロイキン-1により媒介された炎症性腸疾患、インターロイキン-1により媒介された敗血症性ショック、インターロイキン-1により媒介された虚血性損傷およびインターロイキン-1により媒介された再灌流損傷を含むインターロイキン-1により媒介された疾患の治療方法を提供する。

【構成】 治療上有効な量のインターロイキン-1インヒビターをそれを必要とする患者に投与する。好ましい実施態様において、インターロイキン-1インヒビターはIL-1raa, IL-1raB, IL-1rax およびそれらの組合せからなるグループから選ばれる。IL-1raa, IL-1raB, IL-1raxの好ましい製法は組換えDNA技術による。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 治療上有効な量のインターロイキン-1インヒビターをそれを必要とする患者に投与することから成る、インターロイキン-1により媒介された疾患の治療法。

【請求項2】 前記インターロイキン-1インヒビターがタンパク質である請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1raである請求項1記載の方法。

【請求項4】 前記IL-1raがIL-1raa, IL-1raB, IL-1raXおよびメチオニルIL-1raから成る群より選ばれる少くとも1種の化合物である請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記IL-1raがIL-1raaである請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記IL-1raがIL-1raBである請求項4記載の方法。

【請求項7】 前記IL-1raがIL-1raXである請求項4記載の方法。

【請求項8】 前記IL-1raがメチオニルIL-1raである請求項4記載の方法。

【請求項9】 前記IL-1raが組換えDNA法により製造されたものである請求項4記載の方法。

【請求項10】 前記IL-1raが実質的に純粋な形態で製造されたものである請求項9記載の方法。

【請求項11】 前記IL-1インヒビターが製剤上許容しうる担体中にて投与される請求項1記載の方法。

【請求項12】 前記IL-1インヒビターが液体形で投与される請求項1記載の方法。

【請求項13】 前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1結合性タンパク質である請求項1記載の方法。

【請求項14】 前記IL-1結合性タンパク質が可溶性レセプターである請求項13記載の方法。

【請求項15】 前記IL-1結合性タンパク質がモノクローナル抗体である請求項13記載の方法。

【請求項16】 前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1の生産を阻止するものである請求項1記載の方法。

【請求項17】 IL-1の生産を阻止する前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1raである請求項16記載の方法。

【請求項18】 前記インターロイキン-1により媒介される疾患が関節炎、炎症性腸疾患、敗血症性ショック、虚血性損傷、再灌流損傷、骨粗鬆症、喘息、インシュリン糖尿病、骨髄性および他の白血病、乾癬および悪液質/食欲不振から成る群より選ばれるものである請求項1記載の方法。

【請求項19】 治療上有効な量のインターロイキン-1インヒビターをそれを必要とする患者に投与することか

ら成る、インターロイキン-1により媒介される疾患の予防法。

【請求項20】 前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1raである請求項19記載の方法。

【請求項21】 前記IL-1raがIL-1raa, IL-1raBおよびIL-1raXから成る群より選ばれる請求項20記載の方法。

【請求項22】 前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1結合性タンパク質である請求項19記載の方法。

【請求項23】 前記IL-1結合性タンパク質が可溶性レセプターである請求項22記載の方法。

【請求項24】 前記IL-1結合性タンパク質がモノクローナル抗体である請求項22記載の方法。

【請求項25】 前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1の生産を阻止するものである請求項19記載の方法。

【請求項26】 IL-1の生産を阻止する前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1raである請求項25記載の方法。

【請求項27】 前記インターロイキン-1により媒介される疾患が関節炎、炎症性腸疾患、敗血症性ショック、虚血性損傷、再灌流損傷、骨粗鬆症、喘息、インシュリン糖尿病、骨髄性および他の白血病、乾癬および悪液質/食欲不振から成る群より選ばれるものである請求項19記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は種々の疾患および医学的状態の治療のための方法に関する。本明細書記載の方法による治療に適する疾患および医学的状態の共通の要素はインターロイキン-1の関与である。本発明はインターロイキン-1により媒介された疾患および医学的状態の治療のための方法に関する。

【0002】 サイトカインは細胞、特にサイトカインの合成および放出の領域に存在する細胞の挙動を改変する細胞外タンパク質である。今までに発見された最も強力な炎症性のサイトカインの1つで、多くの疾患および医学的状態において鍵となるメジエーターであると考えられているサイトカインはインターロイキン-1 (IL-1) である。インターロイキン-1は、それに限定されるものではないが、マクロファージ/単球系の細胞により生産されるものであり、IL-1アルファ (IL-1a) およびIL-1ベータ (IL-1b) の2つの形態で生産される。

【0003】 もし、自然発生的なまたは実験による疾患もしくは医学的状態が体液または組織中のIL-1レベル上昇と関連するか、または身体より採取された細胞または組織が培養時に高まったレベルのIL-1を生産する場合は、その疾患または医学的状態は「インターロイ

キン-1により媒介された疾患」であると考えられる。多くの場合かかるインターロイキン-1により媒介された疾患はまた以下の付加的な2つの条件によっても認識される：(1)その疾患または医学的狀態に関連する病的所見がIL-1の投与により動物で実験的に模擬できること；および(2)その疾患または医学的狀態の実験的動物モデルで引き起こされた病状がIL-1の作用を阻害する薬剤での治療によって阻止または消失されうることである。ほとんどの「インターロイキン-1により媒介された疾患」においては、3つの条件のうちの少なくとも2つがあてはまり、そして多くの「インターロイキン-1により媒介された疾患」においては3つの条件すべてがあてはまる。インターロイキン-1により媒介された疾患または医学的狀態を掲げると、それらに限定されるわけではないが、以下のとおりである。

【0004】1) 関節炎

2) 炎症性腸疾患

3) 敗血症性ショック

4) 虚血性損傷

5) 再灌流損傷

6) 骨粗鬆症

7) 喘息

8) インシュリン糖尿病

9) 骨髄性および他の白血病

10) 乾癬

11) 悪液質/食欲不良

関節炎は程度の違いはあるが世界中で何百万もの人を苦しめ不具にしている慢性の関節疾患である。この病気は代表的には顕微鏡レベルにおける滑液組織の炎症によって、および関節軟骨および骨を構成する分子成分の進行性退化によって特徴づけられる。関節の持続的な炎症と腐食により、しばしば相当な苦痛、腫脹および機能の喪失に至る。

【0005】

【従来の技術】関節炎の原因はほとんど理解されていないが、最近になり炎症の分子面に関してかなりの量の情報が得られている。この研究により或る種のサイトカイン類が同定され、これらは炎症の媒介に突出した意味をもつと考えられる。関節炎におけるインターロイキン-1の関与は別個の2系統の証拠によって示される。第1に、インターロイキン-1のおよびこれをコードするmRNAレベルの増大が関節の滑液組織および滑液中に見出されている。関連文献にはG. Buchan等、Third Annual General Meeting of the British Society for Rheumatology, London, England, November 19-21, 1988, P. R. J. Rheumatol 25 (補遺 2) 1986; A. Fontanaら、Rheumatology Int., 2, pp. 49-53 (1982); および G. Duffら、Monokines and Other Non-Lymphocytic Cytokines, M. Powanda 編、pp. 387-392, 1988 Alan R. Liss, Inc. が含まれる。

【0006】第2に、健康な関節組織へのインターロイキン-1の投与により、多数の場合に軟骨および骨の腐食を生ずることが示されている。E. Pettipher らの Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第83巻, 第8749-8753頁, 1986に記載されるように、或る実験においてはIL-1をウサギに関節内注射すると、インビボで軟骨の破壊を生ずることが示された。他の研究では、IL-1は組織の外植片における軟骨および骨の両方の退化を生ずることが示された。関連する文献には J. Saklatval らの Development of Diseases of Cartilage and Bone Matrix, Alan R. Liss, Inc., pp. 291-298, および P. Stashenko らの The American Association of Immunologists, Vol. 138, pp. 1464-1468, No. 5, March 1, 1987, が包含される。

【0007】IL-1と炎症の間の因果関係を説明するのに用いられる一般的に受け入れられている説は、IL-1が繊維芽細胞および軟骨細胞のような種々の種類の細胞を刺激して、プロスタグランジンE<sub>2</sub>およびコラゲナーゼのような前炎症性または退化性化合物を生産および分泌するというものである。従って、本発明者らはインターロイキン-1の活性を妨害する物質が出現して関節炎のような炎症性疾患の治療に使用するためのすぐれた候補になるであろうと想定している。

【0008】炎症性腸疾患(「IBD」)は腸管組織の急性および慢性の炎症性状態の両方について述べるのに用いられる用語であって、潰瘍性大腸炎およびクローン病として知られる2つの一般的に別個の病気を包含する。潰瘍性大腸炎は結腸粘膜の潰瘍である。回腸炎、回結腸炎および結腸炎ともよばれるクローン病は、一般的に腸管全体にわたり見出されうる経壁の炎症である。

【0009】IBDは潰瘍、陰窩(crypt abscesses)および著しい繊維症を伴う経壁の急性および慢性の肉芽腫性炎症を含む種々の組織学的特性によって特徴づけられる。これらの指標すべてが全部のIBDの症例において見られるわけではない。自然発生的な再活性化、腸外炎症および貧血がしばしばIBDと関連する。大関節の関節炎は一般にクローン病患者において見られる。

【0010】関節炎に関連する炎症の分子の進行に見られるように、種々のサイトカインがIBDの状況を媒介すると思われることが研究により見出されている。特に、IL-1はIBDにおける媒介物質として関係している。再び、明確な2系統の証拠によりこの結論が導かれた。IL-1のレベル増大がIBD患者の冒された腸領域で見出されている。活性な潰瘍性大腸炎患者の組織は、対照試料に比べて約15倍のIL-1レベルを示した。活性クローン病の組織は対照の約6倍のIL-1レベルを示し、そして不活性クローン病の組織は対照組織試料のその約3倍であった。(Sartor らの Gastroenterology, 94, Pg. A399)(Abstract of paper)参照。Satsangi らの Clin. Exp. Immunol., 67, Pp. 594-605 (1988)

7); Rachmilewitz ら、Gastroenterology, 97, Pg. 326 (1989) も参照されたい (ここで IL-1 濃度レベルを測定するために用いられているバイオアッセイは非選択的に IL-2, IL-4, IL-6 および IL-7 をも検出することが知られている)。

【0011】IBDにおけるIL-1の役割はまた、ウサギの結腸をIL-1で灌流するとプロスタグランジンおよびトロンボキサンの生産を誘発することを示している研究によっても示されている。Comminelli等、Gastroenterology, 97, 1400-1405(1989)。このことは、IL-1は、それが前炎症性のまたは退化性化合物の生産を刺激するゆえに組織の炎症に関連しているという上述の仮説と一致する。従って、全身のおよび局所的IL-1生産はIBDにおける炎症性応答を開始させるかまたはこれに寄与し、そして病気の発病において活性な役割を果たす可能性がある。この全身的なIL-1生産はまたクローン病に関連する腸管外炎症の部分的原因である可能性がある。

#### 【0012】

【発明が解決しようとする課題】これらの結果から、本発明者らはインターロイキン-1の活性を妨害する物質はIBDの治療に有効な化合物となりえようことを提案した。敗血症性ショックは多量の細菌の侵入に関連した状態である。このショックは、少くとも一部分は、細菌性毒素 (例えば、リボポリサッカライド) の存在によりもたらされると一般に信じられている。敗血症性ショックは病院環境における死亡の比較的共通の原因である。現在のところ、敗血症性ショック患者に対する治療選択肢はほとんどなく、利用しうる治療法は一般的に患者の体力を保持させるのに有効であるといった性質のものである。

【0013】敗血症性ショックは平均動脈血圧 (MAP) の低下、心拍出量の減少、頻脈、頻呼吸、乳酸血症および白血球減少を含む種々の症状によって特徴付けられる。この病気の原因は未だ完全には理解されていないものの、インターロイキン-1を含む種々のサイトカインが、敗血症性ショックの媒介に関与している。

IL-1が敗血症性ショックの媒介に役割を有する可能性があることは、2系統の証拠により示唆されている。一つの研究においては、グラム陰性の敗血症に罹患した小児の血清をIL-1濃度に関して分析した。この研究によれば、検査した患者の21%でIL-1レベルの増大が見出されることが示された。加えて、IL-1の血清レベルは生存者よりも死んだ患者において有意に高いことが示された。Girardin等、New England J. of Medicine 319, 第397-400頁 (1988)。また、Cannon等の Critical Care Medicine, 第558頁 (アブストラクト) 4月, 1989 (increased IL-1 levels in patients suffering from sepsis syndrome)も参照のこと。

【0014】また、ヒトIL-1はウサギにショック様

状態を引き起こすことも示されている。ヒトのIL-1bを1回巨丸注射すると血圧低下、および敗血症性ショックに特徴的な幾つかの血行力学的および血液学的なパラメーターがもたらされた。例えば、IL-1を注射したウサギのMAPは最小で19.1%低下した。Okusawa等、J. Clin. Invest., 81, 第1162-1171頁 (1988)。

【0015】本発明者らはこれらの結果から、インターロイキン-1の活性を妨害する物質は敗血症性ショックの治療に有効な化合物となりえようことを提案した。虚血性損傷は組織または器官がその正常な血流を奪われた時はいつでも組織または器官において生じうる。酸素に富んだ血液流がその組織に復旧した場合はさらに損傷が生じうる。生じた損傷の程度および回復性は部分的にはもとの障害のひどさの如何による。しかしながら、種々の治療的な介入により再灌流から生ずる組織損傷の度合を軽減することは可能である。Simpson PJ 等、Halliwell B. (編) Oxygen Radicals and Tissue Injury, Brook Lodge Symp-Upjohn (1988)。

【0016】再灌流損傷は心臓、腸、腎臓、肝臓および他の臓器における虚血性の発現の後遺症として十分に文献に記載されている。Simpson PJ 等、Halliwell B. (編) Oxygen Radicals and Tissue Injury, Brook Lodge Symp-Upjohn (1988); Herman B. 等、FASEB J., 2:1460-1461 (1988); McDougal WS. The J. of Urology, 140:1325-1330 (1988); Finn WF. Kidney Int., 7:171-182 (1990); Schrier RW. Klin Wochenschr, 66:800-807 (1988); および Winchel RJ. Transplantation 48:393-396 (1989)。再灌流損傷の正確な病因は冒された組織の如何に応じて変動する。例えば心臓においては、再灌流損傷は好中球の劇的な流入を伴ない、そしてこれらの細胞は再灌流損傷に影響する主要な役割を果たしていると考えられる。

Lucchesi BR 等、Ann Rev Pharmacol Toxicol 126:201-224 (1988)。一方、腎虚血および再灌流損傷は、管状細胞膜の透過性の増大、細胞内カルシウムレベル増大、ミトコンドリア呼吸機能変化、およびフリーラジカルの発生に関与していると思われる。腎臓にあっては、管外に遊出する好中球が再灌流損傷に影響する役割はあまり確かではない。McDougal WS. The J. Urology, 140:1325-1330 (1988); Finn WF. Kidney Int., 37:171-182 (1990); Schrier RW. Klin Wochenschr, 66:800-807 (1988); および Winchel RJ. Transplantation 48:393-396 (1989)。

【0017】虚血および再灌流損傷の期間中の細胞の関与の差異にもかかわらず、土台となるメカニズムには類似性がある。インターロイキン-1は臓器損傷の初期段階メジエーターとして認識され、そして滞留性のまたは新たに侵入した炎症性細胞によって生成されて器官特異的組織の病状を生ずる。かかる場合、IL-1の生物学的活性を阻害する能力は、組織損傷の度合を限定する場合に目的とされる新規な治療上の介入を表わすである

う。

【0018】この情報から本発明者らは、インターロイキン-1の活性を妨害する物質は虚血および再灌流による損傷を最小限に抑えるのに有効な化合物であり得るということを提案した。今日まで、有効でしかも選択的なIL-1インヒビターは、IL-1が関節炎、IBD、敗血症性ショック、虚血性損傷または再灌流損傷の治療における医薬による介入の標的でありかつ炎症の治療における治療剤として使用するための標的であるということ

を証明できるに十分な量または純度では入手できていない。  
【0019】この従来技術にもかかわらず、本発明者らはインターロイキン-1インヒビターと呼ばれる、インターロイキン-1により媒介される疾患を予防および治療する一群の化合物を同定した。さらに、本発明の治療的介入は、患者が良い状態で存在するのに必須な正常の生理学的過程（例えば、免疫能力）に受容し難い傷害を及ぼすことなく実施できる。

【0020】本明細書で参考文献としてとり込まれる現在継続中の1990年4月6日出願の米国特許出願第07/506,522号には、天然に存在するタンパク質性インターロイキン-1インヒビターおよび高純度のこのものをかなりの量で製造する方法が記載されている。特に上記出願はインターロイキン-1レセプターの拮抗体（IL-1ra）、即ちIL-1 $\alpha$ （IL-1 $\alpha$ ）、IL-1 $\beta$ （IL-1 $\beta$ ）およびIL-1 $\gamma$ （IL-1 $\gamma$ ）の3種のインターロイキン-1インヒビターを詳細に記載している。本出願においては、これらIL-1raはそれぞれIL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  およびIL-1 $\gamma$  と呼ばれるよう。

【0021】

【課題を解決するための手段】

#### 発明の要約

本発明はインターロイキン-1により媒介される疾患を、治療を必要とする患者に治療剤を投与することによる治療法について記載する。本発明の目的は、それを必要とする患者に治療剤を投与することによる、インターロイキン-1媒介関節炎、インターロイキン-1媒介炎症性腸疾患（「IBD」）、インターロイキン-1媒介敗血症性ショック、インターロイキン-1媒介虚血性損傷およびインターロイキン-1媒介再灌流損傷を治療するための方法を提供することである。

【0022】本発明の付加的な目的および利点は、一部は以下の明細書中に記載されており、一部はこの記載から明らかとなるかまたは本発明の実施より知ることができよう。これら目的および利点は特に添付の特許請求の範囲およびその組み合わせによって実現および達成できる。本発明の目的に従って、その目的を達成するために、インターロイキン-1媒介関節炎、インターロイキン-1媒介炎症性腸疾患、インターロイキン-1媒介敗

血症性ショック、インターロイキン-1媒介虚血性損傷およびインターロイキン-1媒介再灌流損傷を含む、インターロイキン-1により媒介された疾患の治療法が開示される。これらの方法は、それを必要とする患者に治療上有効な量のインターロイキン-1インヒビターを投与することから成る。

【0023】本発明の好ましいインターロイキン-1インヒビターはタンパク質であり、より詳細には天然に存在するタンパク質である。天然に存在するタンパク質は、それで治療される患者において予見し得ない副作用を生ずる危険性が比較的低いので好ましい。好ましいクラスのインターロイキン-1インヒビターは当然インターロイキン-1レセプター拮抗体（IL-1ra）として作用するヒトタンパク質である。好ましくは、本発明の実施において好ましいIL-1raはIL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\gamma$ 、またはIL-1 $\gamma$ のN末端メチオニル誘導体から成る群より選ばれる。例えば還流半減期を増大させ、そして/またはその免疫原性を減ずるためにポリエチレングリコール（PEG）または任意の他の反復ポリマーを添加することにより修飾したタンパク質も好ましい。

【0024】IL-1raは、培養ヒト単球の馴化培地からの単離によるような、天然に入手しうる供給源からの抽出により生産できるが、IL-1raの好ましい生産方法は組み換えDNA技法による。組み換えDNA技法は、部分的には比較的多量のIL-1raを比較的高純度で生産できるゆえに好ましい。前記した一般的記載および後記詳細な記載はともに単に例示かつ説明のためのものであり、特許請求された本発明を限定するものではないことが理解されるべきである。

#### 図面の簡単な説明

図1は漸増量のIL-1 $\beta$ にตอบสนองする、ウシ鼻軟骨からのグリコサミングリカン（GAG）の放出を示す。

【0025】図2はウシ鼻軟骨からの、IL-1 $\beta$ 誘導GAG放出に及ぼす漸増量のIL-1raの阻害作用を示す。図3および4はマウスにおけるタイプIIコラーゲン誘導関節炎の発病に及ぼすIL-1raの阻害作用を示す。図5はラットにおけるSCW誘導関節炎のSCW再活性化に及ぼすIL-1raの阻害作用を示す。

【0026】図6はインターロイキン-1媒介IBDの種々の症状に及ぼすIL-1raの治療効果を示す。図7はインドメタシンと一緒に、関節炎症のPG-APS再活性化に及ぼすIL-1raの作用を示す。図8はエンドトキシン誘導ショックでのウサギの生存率に及ぼすIL-1raの作用を示す。

#### 好ましい態様の詳細な説明

本発明の好ましい態様について詳細に記載する。これらは以下の実施例とともに本発明の原理を説明するのに役立てられる。

【0027】上述したとおり、本発明はインターロイキ



ン-1媒介関節炎、インターロイキン-1媒介炎症性腸疾患、インターロイキン-1媒介敗血症性ショック、インターロイキン-1媒介虚血性損傷およびインターロイキン-1媒介再灌流損傷を含むインターロイキン-1媒介疾患の患者の治療方法に関する。この方法は治療上有効な量のインターロイキン-1インヒビターを投与することから成る。一態様においては、本発明の好ましいインターロイキン-1インヒビターはIL-1レセプターの拮抗体(IL-1ra)として作用する天然に存在するタンパク質である。

【0028】もし、自然発生によるか、または実験的な疾患または医学的状态が体液あるいは組織中のIL-1レベル増大と関連するか、またはもし身体から採取した細胞または組織が培養において増加したレベルのIL-1を生成する場合には、その疾患または医学的状态は「インターロイキン-1媒介疾患」であると考えられる。多くの場合、かかるインターロイキン-1により媒介された疾患はまた以下の付加的な2つの条件によっても認識される：(1)その疾患または医学的状态に関連する病的所見がIL-1の投与により動物で実験的に模擬できること；および(2)実験動物モデルにおいて誘発されたこの疾患または医学的状态の病状が、IL-1の作用を阻害する薬剤での治療によって阻止または消失することである。大部分の「インターロイキン-1により媒介された疾患」においては3種の条件のうちの少なくとも2種が当てはまり、そして多くの「インターロイキン-1により媒介された疾患」においては3つの条件すべてが当てはまる。

【0029】インターロイキン-1により媒介される疾患または医学的状态の一覧表は、それらに限定されるわけではないが、以下のとおりである：

- 1) 関節炎
- 2) 炎症性腸疾患
- 3) 敗血症性ショック
- 4) 虚血性損傷
- 5) 再灌流損傷
- 6) 骨粗鬆症
- 7) 喘息
- 8) インシュリン糖尿病
- 9) 骨髄性および他の白血病
- 10) 乾癬
- 11) 悪液質/食欲不良

天然に存在するタンパク質は、部分的にはそれで治療される患者に予期し得ない、かつ望ましくならぬ生理学的副作用を生ずる危険が比較的低いので、好ましい。

【0030】明細書および特許請求の範囲の目的にとって、もしタンパク質または実質的に均等なタンパク質が健康なヒトにおいて通常存在することが見出されう場合は、そのタンパク質は「天然に存在する」とみなされる。「天然に存在する」タンパク質は組み換えDNA技

法によるかおよび通常これを生産する細胞から分離することにより得ることができる。「天然に存在する」とはイー・コリ(E. coli)における発現の結果としてのN末端メチオニル基を含有するタンパク質を包含する。

【0031】明細書および特許請求の範囲を通じて使用されている「実質的に均等な」とは、比較しうる生物学的活性のみならず、非常に高度のアミノ酸残基相同性を有することを意味するものと定義される(一般的には、M. Dayhoff, Atlas of Protein Sequence and Structure, 第5巻, 第124頁(1972), National Biochemical Research Foundation, Washington, D. C., を参照のこと。このものは参考文献として本明細書にとり込まれる。)

【0032】本発明の特に好ましいIL-1raは、現在係属中の米国特許出願にすでに記載されている、インターロイキン-1の調節剤としてインビボで存在する天然に存在するタンパク質である。この出願は、「インターロイキン-1インヒビター」という名称でHannumらにより1988年11月3日に出願された米国出願第07/266,531号である。この米国特許出願は参考文献として詳細に本明細書にとり込まれる。

【0033】いずれも同一のDNAコード配列に由来する3種の好ましい形態のIL-1raは前述のHannumらの明細書に開示され記載されている。これらの最初のものはIL-1raA、等電点約4.8のSDS-PAGEで上22~23kDの分子として挙動し、トリス緩衝液、pH7.6、中約52mM NaClでMono Q FPLCから溶出するものとして特徴づけられる。第2のIL-1raBは、22~23kDのタンパク質で、pI=4.8として挙動し、60mM NaClでMono Q カラムから溶出するものとして特徴付けられる。第3のIL-1raCは、20kDのタンパク質として挙動し、48mM NaClでMono Q カラムから溶出するものとして特徴付けられる。Hannum等の3種すべてのインターロイキン-1インヒビターは同様な機能的および免疫学的活性を有することが示された。本発明はまた修飾されたIL-1raをも包含する。一つの態様においては、IL-1raは1種またはそれ以上のポリエチレングリコール(PEG)または他の反復性重合体部分の付加により修飾される。もう一つの態様においては、IL-1raはE. coliにおける発現の結果としてN-末端メチオニル基を含有する。

【0034】Hannumらのインヒビターを製造する方法も上述の出願中に開示されている。開示された一つの方法は、ヒトの単球からインヒビターを単離することから成る。開示された第2の方法は、インヒビターをコードする遺伝子を単離し、この遺伝子を適当なベクターおよび細胞型中でクローニングし、この遺伝子を発現させてインヒビターを生成させそしてこのインヒビターを収穫することより成る。後者の方法は一般に組み換えDNA法の例であるが、こ

れは本発明の好ましい方法である。組み換えDNA法は、部分的には比較的高純度で比較的多量に製造しうるゆえに好ましい。

【0035】付加的なインターロイキン-1インヒビターには、IL-1に対する細胞性レセプターの活性化を特異的に阻止しうる化合物が包含される。かかる化合物には可溶性レセプターおよびモノクローナル抗体のようなIL-1結合性タンパク質が包含される。かかる化合物にはまたレセプターの拮抗体およびレセプターに対するモノクローナル抗体も包含される。

【0036】第2のIL-1raのクラスには、IL-1のインビボ合成および/または細胞外放出を阻止する化合物およびタンパク質も包含される。かかる化合物には、IL-1遺伝子の転写またはIL-1タンパク質前駆体のプロセッシングに影響する薬剤も包含される。特定の条件下においてはIL-1raはIL-1誘導IL-1生産を阻止しよう。

【0037】好ましくは、前記IL-1raは「実質的に純粋」な形態で前述の方法により生産される。「実質的に純粋」なる用語は、未修飾形におけるインヒビターが比較的高い比活性、好ましくはHannumら、Nature 343:336-340 (1990) および Eisenbergら、Nature 343:341-346 (1990) (これらは両方とも参考文献として詳細に本明細書にとり込まれる) により定義して約150,000から500,000レセプター単位/mgの範囲を有することを意味する。しかしながら、IL-1raの誘導体は異なった比活性を有しうることは理解されるべきである。本発明の好ましい態様においては、IL-1raa, IL-1raBおよびIL-1raxの少なくとも1種を含有する治療用組成物が、インターロイキン-1媒介疾患患者に有効量で投与される。

【0038】好ましいインヒビターの阻害機能は1またはそれ以上の別個の分離しうる部分により付与されることが可能であるから、本発明の方法は、その活性成分がインターロイキン-1の阻害を制御するインヒビターの一部から成るものである治療用組成物の投与により実施できようことも想定される。本発明の治療用組成物は、動脈内注射、吸入ミスト、経口活性製剤または坐剤のような他の有効な投与形態も想定されるが、注射による非経口投与が好ましい。好ましい担体の一つは生理食塩溶液であるが、他の製剤上の許容しうる担体も使用しうることに意図される。好ましい態様の一つにおいては、担体とIL-1raが生理学的に適合する徐放性製剤を構成することも想定される。かかる担体における主要な溶媒は水または本質的に非水性のもののいずれかである。加えて、担体は製剤のpH、浸透性、粘度、透明度、色、滅菌性、安定性、溶解速度または香りを修飾または維持するための他の薬理的に許容しうる付形剤をも含有し得る。同様に、担体はさらに、IL-1raの安定性、溶解速度、放出または吸収を修飾または維持するための他の

薬理的に許容しうる付形剤をも含有しうる。かかる付形剤は、一回量または複数回量の形態における非経口投与用量を製剤化するのに通常一般的に使用される物質である。

【0039】治療用組成物が製剤化されると、これは溶液、懸濁液、ゲル、乳懸液、固体または脱水もしくは凍結乾燥粉末として滅菌バイアル中に貯蔵できる。かかる製剤はすぐ使用しうる形態で、または投与直前に再構成を必要とする形態のいずれかで貯蔵しうる。かかる製剤の好ましい貯蔵は、少くとも4℃以下、好ましくは-70℃の温度でなされる。IL-1raを含有するかかる製剤はまた、生理学的pHまたはその付近で貯蔵され投与されるのが好ましい。高pH (即ち、8より大きい) または低pH (即ち、5より小さい) での製剤の貯蔵および投与は望ましいことではないと現在考えられている。

【0040】IL-1raを含有する製剤の投与様式は、関節内、皮下または筋肉内経路によるのが好ましい。好ましくは、IL-1raを含有する製剤を投与する様式は関節内、皮下、筋肉内または静脈内注射、坐剤、浣腸、吸入エアゾールまたは経口もしくは局所経路である。IL-1raの所望量を達成し維持するには、皮下または筋肉内注射が反復投与される。これらの方法は両方とも患者の血流中にあらかじめ選択した濃度範囲のIL-1raを生成させることを意図する。血漿1ml当たり0.01ng以下のIL-1ra循環濃度を維持しても有効な組成物ではないし、一方1ml当たり1.00μg以上の循環レベルを長期に維持することは望ましくない副作用を生ずる可能性があると考えられている。

【0041】インターロイキン-1媒介関節炎を治療するための好ましい用量範囲は1から100ng/mlである。したがって、最初に血漿1ml当たり10ngをこえるIL-1ra循環レベルを生ずる量を投与し、そしてその後血漿1ml当たり約10ngまたはそれ以上のIL-1ra循環レベルを保持するに適する頻度で投与がなされるのが好ましい。投与頻度は用いられる製剤中のIL-1raの薬動的パラメーターの如何によろう。

【0042】インターロイキン-1媒介IBDの治療に好ましい用量範囲は患者の体重1kg当たり約0.5~50mgであり、1日約1~10回投与される。より好ましい態様においては、投与量は患者の体重1kg当たり約1~10mgであり、1日約3~5回投与される。投与の頻度は用いられる製剤中のIL-1raの薬動的パラメーターの如何によろう。

【0043】インターロイキン-1媒介敗血症性ショックの治療に好ましい用量範囲は24時間当たり患者の体重1kg当たり1日約1.0~2.00mgであり、24時間当たり約4~15回の間で等量ずつ投与される。さらに好ましい態様においては、投与量は1日当たり患者の体重1kgについて約10~120mgであり、2時間毎に等量ずつ投与される。最も好ましい態様においては、患者の体重1kgあた



り24時間について100mgが2時間毎に等量ずつ投与される。投与頻度は用いられる製剤におけるIL-1raの薬動学的パラメーターの如何による。

【0044】インターロイキン-1媒介敗血症性ショックの治療に好ましいもう一つの様式においては、最初にIL-1raが巨丸注射され、続いて循環IL-1レベルがもはや上昇しなくなる迄、IL-1raが連続的に注入される。治療の目的は血清IL-1raレベルをこの期間中2~20 $\mu$ g/mlに維持することである。この様式の好ましい態様においては、最初に患者の体重1kg当たり約10~20mgのIL-1raを巨丸投与し、続いて患者体重1kg当たり毎分約5~20 $\mu$ gのIL-1raを循環IL-1レベルがそれ以上増大しなくなる迄連続的に投与する。血清IL-1bレベルは市販で入手しうるイムノアッセイ試験キットにより確認できる。IL-1媒介敗血症性ショックの治療の開始は治療のいずれの様式においても、敗血症または敗血症の可能性が診断されたら可能な限り速やかに開始しなければならない。例えば、治療は敗血症性ショックを生ずる危険性がある手術または事故または他の出来事の後、速やかに開始しうる。

【0045】インターロイキン-1媒介虚血性および再灌流損傷の治療のための好ましい用量範囲は、患者の体重1kg当たり約1~50mgであり、毎時間ごとに投与される。好ましい態様においては、最初に約15~50mg/kgのIL-1raが巨丸投与され、続いて約5~20mg/kgが毎時注射される。投与頻度は用いられる製剤中のIL-1raの薬動学的パラメーターの如何による。

【0046】IL-1raを含有するある種の製剤は経口投与することも意図される。この様式で投与されるIL-1raはカプセル化されるのが好ましい。カプセル化されるIL-1raは固形投薬形の製剤化に通常使用される担体を用いてまたは用いずして製剤化できる。バイオアベイラビリティが最大となりそして全身に行きわたる以前の分解が最小となる時点で製剤中の活性部分が胃腸管に放出されるように、カプセルが設計されるのが好ましい。IL-1raの吸収を促進するために付加的な付形剤を包含できる。希釈剤、芳香剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤、崩解剤および結合剤も使用し得る。

【0047】インターロイキン-1媒介IBDの治療に用いられる場合は、IL-1raの投与は適当に製剤化された浣腸によっても達成できる。投与様式の如何にかかわらず、詳細な投与量は、患者のおよその体重または表面積に従って計算される。さらに、前記各製剤に関する治療のためのおよその投与量を決定するのに必要な計算の改善は、当業者ならばルーチンに行うことができ、そしてこれは莫大な実験を行うことなく、特に本明細書に開示された投与量の情報およびアッセイに照らして、ルーチン的になし得る業務の範囲内にある。これらの投与量は適切な用量-応答データと一緒に用いられる、投

与量決定のための確立されたアッセイを使用することにより確認できる。

【0048】本明細書に記載されているIL-1ra製剤はヒトへの使用のみならず獣医用にも使用しうることを、および「患者」なる用語は限定された態様に解釈されるべきでないことに留意すべきである。獣医用の場合、投与量は上記で特定したのと同じである。本発明の教示を特定の問題または環境に応用することはここに含まれる教示に照らして当業者の能力の範囲内にあることが理解される。本発明の代表的な使用例は以下の実施例にみられる。

【0049】実施例1-3においては、IL-1raが既知の関節炎モデル例えば Wilder, R. L., "Experimental Animal Models of Chronic Arthritis," Goodacre, J. A.および W. C. Dick(編)、Immunopathogenic Mechanisms of Arthritis, Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, Netherlands; Boston, Mass. (1988) (これは参考文献として本明細書に詳細にとり込まれる) 記載のものにおけるIL-1の作用を完全にまたは部分的に阻止および/または中和することが示される。実施例で注目されるように、各モデルにおいて試験されたIL-1raは有益な結果を示した。

【0050】実施例4-6においては、IL-1raはZipserら、Gastroenterology, 92, 第33~39頁 (1987) (本明細書に参考文献としてとり込まれる) および Sartorら、Gastroenterology, 89, 第587~95頁 (1985) (本明細書に詳細にとり込まれる) に記載されているような既知IBDモデルにおいて、IL-1の作用を完全にまたは部分的に阻止および/または中和することが示される。実施例で注目されるように、各モデルにおいて試験されたIL-1raは有益な結果を示した。

【0051】実施例5においては、IL-1raはSartor IBDモデルに関連した腸外炎症に対して有益な結果を有することが示される。実施例6においては、NSAID-インドメタシンの投与から起こる腸の炎症もIL-1raでの治療により中和される。実施例7では、IL-1raは既知敗血症性ショックのモデルにおいて、部分的にIL-1の作用を阻止および/または中和することが示される。敗血症性ショックを引き起こすために、敗血症性ショックの主要原因であると信じられているエンドトキシンをウサギに静脈注射する。異なる量のIL-1raを投与したウサギ群の死亡率を検査した。実施例で見られるように、IL-1raでの処置は有益な結果を示した。

【0052】実施例8では、虚血および再灌流損傷実験においてIL-1raが部分的にIL-1の作用を中和することが示される。犬を2時間局所的な心筋虚血状態にし次いで4時間再灌流させる。梗塞のサイズを室の大きさのパーセントとして、および危険にさらされた部分のパーセントとして測定した。IL-1raでの処置は有益

な結果を示した。

実施例1: 培養したウシ鼻軟骨外植片におけるヒトインターロイキン-1 インヒビターの作用の証明

関節炎の進行を研究するために、多くのインビトロおよびインビボの方法が用いられている。この点で特に有用であることが判明しているインビトロモデルの一つは、培養した軟骨性組織外植片である。実際に、このモデルはIL-1が軟骨破壊の強力なメジエータであり、それゆえ関節炎性関節腐食における介入にとって好都合なターゲットであることを示すために過去において使用されてきた(一般的には G. Buchanら、Third Annual General Meeting of the British Society for Rheumatology, London, England, November 19-21, 1988, PR. J. Rheumatol 25 (Supplement 2) 1986; Fontanaら、Rheumatol Int (1982) 2: 49-53; J. Saklatvalaら、Development of Diseases of Cartilage and Bone Matrix, Alan R. Liss, Inc., pp. 291-298; P. Stashenkoら、The American Association of Immunologists, Vol. 138, pp. 1464-1468, No. 5, March 1, 1987; G. Dodgeら、J. Clin. Invest., 83:647-661; J. Sandyら、Journal of Orthopedic Research 4:263-272; J. Saklatvalaら、The Control of Tissue Damage, Glauert, 編、Elsevier Science Publishers, pp. 97-108; I. Campbellら、Biochem. J. 237:117-122; J. Tyler, Biochem. J., 225:493-507; および J. Eastgateら、Sixth International Lymphokine Workshop, 7(3): 338, これらは全て参考文献として詳細にとり込まれる、を参照のこと)。

【0.053】Steinbergら、Biochem. J. 180: 403-412(本明細書に参考文献としてとり込まれる)に実質的に記載されている軟骨外植片モデルが、IL-1媒介軟骨の破壊に及ぼすIL-1raの軽減作用を示すためにこの実施例で使用された。ここでは、軟骨組織の出所としてウシ鼻中隔を使用した。J. Tylerらの Br. J. Theumatol 24(補遺 1): 150-155(ここに参考文献としてとり込まれる)記載の種類の関節軟骨も使用できた。

#### 軟骨の調製

新たに屠殺された1才の雄の子牛からウシ鼻中隔をとり出し、氷上に置いた。この組織を次にポビドン/ヨウ素の準備試液(1-エタノール-2-ピロリジノシホモポリマーおよびヨウ素、Medline Industries, Mundelein, Illから入手)で洗った。次いで、粘膜および軟骨膜を除去した。残った軟骨中隔をポビドン/ヨウ素の5%(v/v)溶液に室温で1時間浸した。

【0.054】次に以下の操作を層流フード中で無菌的に実施した。中隔をGeyの平衡塩溶液(GIBCO Laboratories, Grand Island, NY)で反復してすすいだ。軟骨シートを次々に無菌表面に置き、均一の8ミリ栓を標準のコルク穴あけ器を使用してあけた。カミソリの刃を使用して、頂部と底部表面を約1~2ミリ除いた。これら栓をGeyの平衡塩溶液中に保持した。異なった雄牛からとり

出した栓は別個に保持した。

【0.055】各栓を次に数個の0.8ミリディスク切片とした。使用した切断装置はSteinbergら、Biochem. J. 180:403-412に記載されている種類のアルミニウムブロックであった。得られたディスクは、一貫して湿重量40~50mgであった。このディスクを、10%ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、およびネオマイシンを補添したダルベッコ改良イーグル培地(すべての試薬はGIBCOから入手、以下、ここでは単に「培地」と称する)中で培養保持した。培養物は5%CO<sub>2</sub>、37°Cのインキュベーター中に維持した。

【0.056】各雄牛から得た代表的なディスクを次いで培養培地中へのグリコサミノグリカン(GAG)の放出により示される、IL-1Bへの応答能力について試験した。(グリコサミノグリカンは、細胞マトリックスが退化すると細胞から放出される。)GAGの存在は、FerdaleらのConnective Tissue Research, 9:247-248, (これは参考文献としてここにとり込まれる)に記載されたようにして、9-ジメチレンジエチレンブルーを使用して検出した。刺激していない鼻の率に比較して、GAGの生成を2倍またはそれ以上に増加させることによって5ng/mlのIL-1Bに反応したディスクを選択して次の実験で使用した。これらのディスクは以下「IL-1B応答性ディスク」と呼ぶ。

#### IL-1用量応答

この予備実験は、漸増量のIL-1Bに対して用量応答曲線が存在するかどうかを判定するために実施した。

【0.057】最初に、数個のIL-1B応答性ディスクを1/40の小片に切った(余部は、後の実験のために別にした)。IL-1への応答は動物ごと、ディスクごとに、そしてスライスごとにしばしば変動があるので、この実験の工程は各切片がその対照として使用されるよう設計された。第2に、各スライスを一定量の前記培地を含有する48ウェル組織培養クラスター(Costar, Cambridge, MA)の1つのウェル中でインキュベートした。48時間後、各培養物の上清中に存在するGAG量を測定した。次にこの量を組織の1mg湿重量当たりのGAGのμgによって各培養物ごとに標準化した。こうして、IL-1の非存在下における基礎的GAG放出割合を各スライスごとに確立した。

【0.058】第3に、すべての培養物からの上清を捨て、異なる量のIL-1Bを含有する新たな培地で置き換えた。IL-1Bは自家製造し(J. Childs, notebook 935, 第49~52頁)、特性決定後その使用を必要とするすべての実験で使用した。IL-1Bと48時間培養後、培養物からの上清を回収し、それぞれ存在するGAG量を測定した。これらの量を各培養物につき前記のように標準化した。次いで、IL-1B誘導による割合から基礎割合を差引いた。その結果を図1に示す(この結果はまた表形式にて表1にも掲げる)。図1に明らかに示さ

れるとおり、軟骨性組織からのGAGの放出は、投与されたIL-1B量に依存する。

【0059】48時間の培養期間中に、5ng/mlのIL-1Bは容易に測定しうるGAG放出増大を起こすゆえ、この濃度を以下の実験で用いた。

IL-1誘導GAG放出に及ぼすrIL-1raの作用  
残るIL-1B応答性ディスクの数個を次に1/4のスライスに切った。上述のように、各スライスをそれぞれ自体の対照として用いた。

【0060】各スライスは、48ウェル組織培養クラスター中一定量の前記培地と48時間インキュベートした。各スライスごとにGAG放出の基礎割合を測定した。次いで、培養物からの上清を捨て、5ng/mlのIL-1Bおよび異なる量の組織学的に生産されたIL-1ra(rIL-1ra)を含有する新たな培地で置換した。48時間インキュベート後、上清を回収し、そしてGAG量を測定した。これらの量を、rIL-1ra/IL-1B刺激GAG放出割合を基礎GAG放出割合で割ることにより各培養物につき標準化した。結果を図2に示す。図2に明らかに示されるように、軟骨性組織からのGAG放出は、IL-1Bと比較してrIL-1raの濃度増大により減少した。例えば、rIL-1raをIL-1Bと比較して10倍モル過剰にすれば、(IL-1BとrIL-1raの分子量はともに約17kd)、GAG放出割合を基礎レベルに戻すのに十分であった。同様に、rIL-1raをIL-1Bに対して、1.5倍モル過剰にすれば、GAG放出の刺激をIL-1B単独の存在下に観察された値の50%に減少させるのに十分であった。

【0061】これらの結果は数頭の異なった雄牛に由来する軟骨を使用して再現された。

#### rIL-1raの細胞毒性の欠如

rIL-1raが非細胞毒性であることを示すために、本発明者らは残るIL-1B応答性ディスクからスライスをとり、そしてこれをIL-1Bの非存在下に種々の量のrIL-1raに露出させた。rIL-1raもIL-1Bも存在しない場合にはGAG放出割合は同一であった。

【0062】次いで、IL-1raの作用が可逆であることを示すために発明者らは培養スライスの上清からrIL-1raを除去し、これにIL-1Bを投与した。このスライスは、IL-1B用量応答実験において応答したと全く同様の応答をした。IL-1B、およびIL-1Bの作用を完全に阻止するに十分な濃度のrIL-1raで処理された軟骨を次にIL-1B単独にさらすと同様の結果が得られた。

実施例2：マウスにおけるコラーゲン誘導関節炎に及ぼすヒトインターロイキン-1インヒビターの作用の証明  
マウスのタイプIIコラーゲン誘導関節炎ヒトリウマチ様関節炎と多くの類似性を有しておりそしてこの数年間この疾患の特定の面を研究するのに使用されてきた。J. S

tuartら、The FASEB Journal, 第2巻, No.14, 第2950~2956頁, November 1988, これは参考文献としてここにとり込まれる。リウマチ様関節炎におけるIL-1の関与の可能性は、S. Stimpson らによって注目されている。The Journal of Immunology, 第140巻, 第2964~2969頁, No.9, May 1, 1988, これも参考文献としてここにとり込まれる。

【0063】この実験の目的は、rIL-1raの全身投与がマウスにおけるタイプIIコラーゲン誘導関節炎の発病に軽減効果を有することを証明することであった。Jackson Laboratoriesから購入した24匹のマウスDBA/1マウスをフロインド完全アジュバント中の0.1mgのニワトリタイプIIコラーゲンで免疫した。免疫後14日目、それぞれ12匹ずつの2群にランダムに分けた。実験群には、1日2回、約0.1mgのrIL-1ra/kg注射を腹腔内投与した。免疫後47日目に(即ち、投薬34日目に)動物を殺すまで注射を続けた。対照動物には同じスケジュールで、同量の担体(10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム)を注射した。

【0064】冒された四肢を計測し、そして実験期間中、1週間に約3回臨床評点した。各動物の臨床評点は、0~4点を基礎として、盲検者により評価した各足部により確認される関節炎のひどさを表わす。臨床的に観察し得る関節炎の最初の徴候が注目される26日目から、動物を殺す47日目までの各動物の臨床評点を表2に示す。冒された四肢の得点および各群に対する臨床評点の合計も表2に示される。これらの結果はそれぞれ図3および図4に時間の関数としてグラフに示す。明らかに判るとおり、病気の発生とひどさはrIL-1raの投与によってかなり低下した。

実施例3：ストレプトコッカス細胞壁(SCW)誘導ラット関節炎のSCW誘導再活性化に及ぼすヒトインターロイキン-1インヒビターの作用の証明

ストレプトコッカス細胞壁誘導関節炎については、R. L. Wilder が Immunopathogenetic Mechanisms of Arthritis, 第9章, 標題 "Experimental Animal Models of Chronic Arthritis"において、"実験的な関節疾患の臨床的、組織学的および放射線学的特徴は、成人および若年者のリウマチ様関節炎で観察されるものと密接に類似している"と述べている。

【0065】以下の実験では、Esser らの Arthritis and Rheumatism, 28: 1401-1411, 1985 (これは参考文献としてここにとり込まれる)に開示されているモデルを使用する。このモデルは簡単に要約すると以下のとおりである：ストレプトコッカス細胞壁(SCW)をルイスラットの足くるぶし関節に関節内注射した。反対側の関節に食塩水を注射して対照とした。20日後、この間に最初の炎症は静まったが、SCWを再びこんどは静脈内注射により投与した。このSCW量はそれ自体で関節炎症を起こすには不十分であり、それゆえ食塩水を注射した

足関節にはほとんどまたは全然影響を与えなかった。しかしながらこれに対して、この量は予めSCWを注射した足くるぶしにおける炎症および関節破壊を再活性させることができる。SCWの2回目の投与に続いて炎症の程度を評価するため、足関節の寸法を毎日測定した。

【0066】上述モデルで実施した多くの実験の1つにおいて、12匹のラットの2つの群を用いた。各動物には、右の足くるぶしにSCW (1.8  $\mu$ g ラムノース等価) を、左の足くるぶしに同量の発熱物質不含食塩水を注射した。足くるぶしの寸法を1~6日目まで測定した。20日目に、ラットの1つのグループには1mg/kgのIL-1raを水性担体中で腹腔内注射した；他の群には同量の担体溶液のみを腹腔内注射した。1時間後、各動物にSCW (100  $\mu$ g ラムノース等価) を静脈注射した。10分後に、処理群には1mg/kgのIL-1raを、そして対照群には担体のみを腹腔内注射した。SCW投与2および6時間後、1mg/kgのIL-1raを皮下注射し、その後6時間毎に3日間反復した。

【0067】表3および図5は、実験期間中における処理群と対照群の二群に関する食塩注射くるぶしおよびSCW注射くるぶしの寸法を示す。予想したとおり両群のSCW処理くるぶしはSCWの静脈注射に応答して腫脹した。しかしながら、処理群間で応答は異なっていた。対照群の足くるぶしは最初の3日でもとの大きさよりも30%腫脹したのに対して、処置群の足くるぶしは同じ期間に14%しか腫脹しなかった。加えて、SCWの静脈注射後1~5日目で、SCW処置群および反対側の対照くるぶし群の両群の寸法に統計的に有意の差があった(独立平均に関する2-テイルt-テストで $p < 0.001$ )。

【0068】8日目にラットを殺し、両方の足くるぶしをホルマリンに固定した。固定した関節から石灰質を除去、染色しそして検査した。軟骨腐食、滑液の炎症、骨膜炎および滑膜炎に関して、対照群と処置群の間で有意差が見られた。これらの差異を表4に示す。

実施例4：ホルマリン-免疫複合体誘導IBDに及ぼすヒトインターロイキン-1インヒビターの作用の証明  
アラキドン酸由来炎症性メジエーターの役割を研究するため、そしてIBDにおける治療方を評価するためにホルマリン-免疫複合体IBDのウサギモデルが使用されている。Zipser等、前出；Brown等、1987 Gastroenterology 92: 54-59；Schumert等、1988 Prostaglandins 36: 565-577、これらは参考文献としてここにとり込まれる。

【0069】後記する実験は、Zipser等の上掲のものの中に開示されたモデルを使用する。このモデルは活性な潰瘍性大腸炎に類似の症状を生じ、簡単に述べると以下のとおりである：ホルムアルデヒドをカテーテルからウサギの結腸に投与しそして一定期間後、動物に抗原が過剰の免疫複合体を注射する。IBD誘発に続く経時的研究は、48時間後に動物を殺して結腸を摘出することによ

って実施した。結腸を組織学的に評価した。IBDの誘発前および後での、炎症、浮腫および壊死に及ぼすIL-1ra処置の効果を非処置対照動物と比較した。

#### IBDの誘発

Kirsnew等、1957, Trans. Assoc. Am. Physicians 70: 102-119；Hodgson等、1978, Gut 19: 225-32 (これらは参考文献としてここにとり込まれる) の結腸炎の免疫複合体方法を改変したものを使用して、雄のニュージーランドウサギ(2.2~2.5 kg) の遠位結腸に炎症を誘発させた。麻酔したウサギ(キシラジンおよびケタミン) の遠位結腸に10cm挿入したカテーテルを介して、4 mlの0.45% (V/V) 非緩衝ホルムアルデヒド (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA) を投与した。2時間後、動物に耳静脈から抗原過剰の免疫複合体0.85mlを与えた。この複合体はZipserら、前出、に記載されるようにして、ヒト血清アルブミン(500  $\mu$ g/ml) をウサギ抗ヒト抗血清 (ICN Immunobiologicals, Costa Mesa, CA) とインキュベートし、上清をデカンテーションしそして沈殿した免疫複合体をアルブミン溶液(6mg/ml)を用いて再溶解させることにより製造した。

【0070】組織学的評価は、各結腸から得られた最低限2個の長方向切片について行なった。すべての結腸試料は1人の病理学者が盲検的に検査した。粘膜と粘膜下組織は急性炎症性細胞の浸潤に関して別々に評価した(好中球および好酸球)。検査した各領域に関し次式を使用して、ハイパワー域(high power field: HPF)当たりの白血球(L)の半定量的評点をつけた：0=0または1；0.5=2-9；1=10-20；1.5=20-30；2=31-40；2.5=41-50；3=51-65；3.5=66-80；4>=81 L/HPF。最小限、各標本からの粘膜と粘膜下組織の8個のHPFが各切片において別々に評価された。炎症指数は、粘膜および粘膜下組織の評価に対する平均得点を加えることによって計算した。浮腫は0~4のスケールで半定量的に評価した。壊死は関与する粘膜のパーセントとして表わした。ホルマリンの投与に続く免疫複合体の投与により、遠位結腸は急性炎症を生ずる。これは、好中球の主に粘膜および粘膜下組織への浸潤、粘液枯渇、陰窩膿瘍、浮腫および粘膜壊死散乱領域により特徴づけられ、それぞれ0.3 $\pm$ 0.1(0時間) から4.5 $\pm$ 0.7 (48時間) ( $p < 0.001$ )、0.3 $\pm$ 0.1 から3.6 $\pm$ 0.3 ( $p < 0.001$ )および0%から89% ( $p < 0.001$ )まで漸進的に増加した。これらのパラメーターの引き続いての減少は、IBDの誘発96時間後に観察された( $p < 0.01$ 対48時間)。

#### IL-1raでの処置

一群の動物にIL-1ra (5mg/kg；n=8) または担体のみ(n=10) を下記6時点で静脈処理した、すなわち2時間前および免疫複合体の投与1, 9, 17, 25, 33時間後。IBD誘発48時間後ウサギを殺し、そして結腸組織の炎症を分析した。

【0071】IL-1raでウサギを処置すると担体処置IBD動物に比較して炎症指数を $3.2 \pm 0.4$ から $1.4 \pm 0.3$  ( $p < 0.02$ )に、浮腫を $2.2 \pm 0.4$ から $0.6 \pm 0.3$  ( $p < 0.01$ )に、そして壊死を $43 \pm 10\%$ から $6.6 \pm 3.2\%$  ( $p < 0.03$ )に減少させた。8図。この結果は、IBDの幾つかの徴候はIL-1raでの処置によって有意に減らし得ることを示している。

実施例5：ラットにおける細菌細胞誘導IBD

他の多くのIBDモデルとは異なり、細菌細胞壁誘導IBDモデルは慢性IBDまたはクローン病の徴候の大部分を示す。慢性肉芽腫性応答の形成に加えて、このモデルは自発的再活性化、貧血および腸管外炎症を受けやすい。

【0072】IL-1媒介IBDに対するIL-1raの軽減作用を証明するために、Sartorら、上記によって実質的に記載された細菌細胞壁モデルをこの実施例で用いた。実験は一般に次のように行った：A群ストレプトコッカスからのペプチドグリカンポリサッカライドの滅菌音波処理物を静脈内注射することにより、ラットにIBDを誘導した。結腸の一過性点状出血が注射後2〜3分以内に現われ、48〜72時間までに解消する。動物のサンプル群を、IBD誘導に続いてIL-1raで処理し、ある期間経過後、動物を殺し、結腸を摘出し、全般的病理を評価した。

IBDの誘導

細菌細胞壁物質は、Stimpsonら、1986, Infect. Immun. 51: 240-249 (これは参考としてここに組込まれる)に記載された操作法に従って製造された。Lewisラットにストレプトコッカス細胞壁を皮下注射により与える。この注射により局所および全身的障害が生じ、これには腸の癒着および小結節、肝重量増加および肝小結節、ヘマトクリットおよびヘモグロビンレベルの低下、白血球数(WBC)の増加、生長速度の低下および関節炎に特徴的な関節の腫脹(添加のStartorら、Gastroenterology, 89: 587-595, 1985 参照、これは参考としてここに取込まれる)が含まれる。このモデルを用いて、IL-1raによる処置について3つの別個のプロトコルを行い、小結節および癒着の減少がそのすべてにおいて観察された；最後の2つのプロトコルにおいては癒着の減少は統計学的に有意であった。

プロトコルA

ラット12匹の2つの群を用いた。第1日目に両群にストレプトコッカス細胞壁由来のペプチドグリカンポリサッカライド(SCWPG-APS)合計 $15 \mu\text{g}$ を盲腸で3箇所、バイエル板で2箇所および管回腸で2箇所の7箇所に与えた。第11日目に、関節腫脹、下痢および出血性鼻を含む病気の明白な徴候が現われた。この時点で一方の群にIL-1ra ( $8 \text{ mg/kg}$ )を12時間毎に皮下投与し、第2群は同じくブラシーボ(PBS)で処置した。足首関節の寸法を毎日測定した。第18日目に動物を殺

し、肉芽腫および癒着の存在に関して0〜4の段階で腸管を採点した(表5)。IL-1ra群は小結節および癒着がより少なかった。IL-1ra群は肝もより小さかった。IL-1ra群は白血球数(WBC)が減少していた。

プロトコルB

このプロトコルは、PG-APSの使用量を $12.5 \mu\text{g}$ に減少させ、そしてIL-1raでの処置を第8日目に開始した以外はプロトコルAで用いたと同様であった。プロトコルAにおけるように、盲腸小結節、腸管癒着、肝重量およびWBCの減少が観察された(表6)；癒着の減少は $p < 0.02$ レベルで有意であった。

プロトコルC

ここで用いたプロトコルもまた、PG-APSの量を $12.5 \mu\text{g}$ に減少させ(プロトコルBと同様)、そして処置群をPG-APS注射の直後にIL-1ra  $8 \text{ mg/kg}$ 皮下および $2 \text{ mg/kg}$ 静脈内で始めた以外はプロトコルAと同様であった。さらに、第1日目に4、10および18時間毎に、第2日目に8時間毎に、そして実験期間中に12時間毎にIL-1raの皮下注射( $8 \text{ mg/kg}$ )を与えた。内臓の病変を調べるために各群の動物5匹を第3日目に殺し、残りを第18日目に殺した(表7)。第3日目において、内臓病変を示す広範囲なパラメーターが減少し、そして癒着が減少し有意( $p = 0.07$ )に近づいた。第18日目に殺した群の結果は、対照群動物のうちの1匹に病気が現われなかったため混乱したものであった。しかし、IL-1ra群における癒着の減少は $p < 0.02$ レベルでなくとも有意であり、IL-1ra群では体重増加も有意に大きかった。

実施例6：ラットにおけるNSAID誘導IBD

IL-1raの抗炎症作用がNSAIDの作用と相加的であるかどうかを決定する試みにおいて、実施例3に記載したようにPG-APSの静脈内注射ののち、ラットをインドメタシン(活性化後に、24および36時間での再活性化時点で、そして6日まで12時間毎に $2 \text{ mg/kg}$ )、IL-1ra(2および6時間に、次いで36時間まで6時間毎に、そして7日まで12時間毎に $2 \text{ mg/kg}$ )、および両方の薬物の組合せにより処置した(図7)。

【0073】インドメタシン単独群はIL-1ra単独群

よりも大きな関節腫脹減少を示した。しかし、インドメタシン群は病気で、実験経過中に2匹の動物が死んだ。両方の薬物を与えた群はインドメタシン単独群よりもいっそう良好であり、関節腫脹が少なく、そして2つの群間の差は第4日目に $p < 0.03$ で、第7および8日目に $p < 0.06$ で統計学的に有意であった。群では病気の動物はおらず、中部小腸での潰瘍形成が少なかった。中部小腸での潰瘍形成は慢性的な経口NSAID患者において併発する。従ってIL-1raはNSAIDのIBD様併発のいくつかを軽減するものと思われる。

【0074】表8は、IL-1raが腸管の症状—潰瘍、



癒着、腸管肥大およびミレロ (mylelo) ベルオキシダーゼ (MPO) レベル—ならびに全体的症状—ヘマトクリット (HCT)、ヘモグロビン (Hgb) およびWBC レベル—の双方に及ぼす作用を示す。

実施例7: エンドトキシン誘導敗血症性ショックに及ぼすヒトインターロイキン-1レセプター拮抗体の作用の証明

エンドトキシン誘導敗血症性ショックの研究をブルーチンチラウサギにおいて行った。実験プロトコルは群死亡率以外は誘導された敗血症性ショックの症状には何ら集中されなかった。エンドトキシンおよび他の細菌産物の発熱および代謝作用に対するウサギの感受性はヒト患者のそれと類似しているため、ウサギをこの研究に使用した。

【0075】エンドトキシンを時点ゼロで静脈内に1回注射することによりショックを誘導した。-10分、時点ゼロおよびその後24時間の期間中2時間毎にウサギに周期的静脈内注射を与えた。この研究の結果を表9に示す。表9において、A群ウサギ (n=5) には時点ゼロでどのエンドトキシンをも与えず、周期的注射時点でIL-1ra不含食塩水注射を与えた。B群ウサギ (n=10) には体重1kg当り0.5mgのエンドトキシンを時点ゼロで与え、ここでもまた周期的注射はIL-1ra不含であった。7日後にB群ウサギの生存率はわずかに20%であった。

【0076】C~E群 (n=10) においてはエンドトキシンを時点ゼロで投与し、食塩水注射は変動量のIL-1raを含有していた。C群ウサギには体重1kg当り合計で10mgのIL-1raを与えた。D群ウサギには体重1kg当り合計で30mgのIL-1raを与えた。最後に、E群ウサギには体重1kg当り合計で100mgのIL-1raを与えた。7日後にE群ウサギの生存率は90%であった。

【0077】この実験は図8にグラフで示されており、IL-1raでの処置がエンドトキシン誘導ショックを有するウサギの最終死亡率を有意に遅延させかつ低下させることを示す。

実施例8: 虚血および再灌流損傷に及ぼすヒトインターロイキン-1レセプター拮抗体の作用の証明

次の実施例においては実験用イヌを2時間局所的な心筋性虚血となし次いで4時間再灌流させた。これらの犬を2つの群に分け、一方の群をIL-1raで処置し、他方を試験群に用いたのと同じ緩衝液中の血清アルブミンで処\*

(エンド拡張期壁厚-エンド収縮期壁厚)

壁肥大 =  $\frac{\text{エンド拡張期壁厚} - \text{エンド収縮期壁厚}}{\text{エンド拡張期壁厚}} \times 100\%$

エンド拡張期壁厚

壁肥大の正常範囲を3つの心周期についての基線イメージの関数マップから決定し、95%耐性限度を各動物において確立した。これらの限度を遮断および再灌流関数マップとの比較に用いた。異常性は機能不全の円周範囲および機能不全の程度として表わされる。機能不全の範囲

\*置した。

【0078】動物を1昼夜絶食させ、翌朝5%チアミールナトリウム10ml、次いで6%ナトリウムベントパルビタール2mlの静脈内注射により麻酔した。必要に応じ追加のナトリウムベントパルビタールを実験中に投与した。Harvard レスビレーターにより人工呼吸を維持した。第5肋骨内腔を通して左開胸を行い、液体および薬物投与のために左内側頸静脈中に、そして血圧をモニターし標準血液サンプルを採血するために左内側頸動脈および大腿動脈中にポリビニルカテーテルを配置した。放射性小球を注射するために左心房に1本のカテーテルを配置した。左回旋動脈を切開して周囲の組織を除去し、電磁流プローブをこの血管上に第1純角境界ブランチの近位に置いた。リドカイン50mgを静脈内巨丸注射したのち、回旋冠動脈を係蹄遮断子で2時間遮断した。電磁流プローブにより完全な遮断を確かめた。次いで係蹄を突然にゆるめ、冠血管床の再灌流を4時間行わせた。

【0079】2次元超音波心臓検査図および血行動態量 (心拍、血圧および左心房圧) を、遮断の前、遮断の10分後、再灌流の5分後および再灌流の4時間後に測定した。2次元超音波心臓検査をスキャナーおよび2.25MHzトランスデューサーを用いて行った。このトランスデューサーを毛をそったクローズド右胸の上に置き、左心室の円周範囲が短軸投射で充分に見えるようにした。超音波心臓イメージを中部乳頭筋の位置でソニーレコーダを用いてビデオカセットに記録した。ミニコンピュータを基礎とするビデオデジタル化系を用いて2次元超音波心臓分析を行った。

【0080】エンドー拡張期のマーカーとしてリードIIにおけるQ波の開始およびエンドー収縮期のマーカーとして最小の左心室腔の大きさをを用いて分析するために、エンドー拡張期およびエンドー収縮期のフレームを選択した。正常な洞リズム中の3連ビートに関する心内膜および心外膜の境界をビデオディスプレイから直接にデジタル化タブレットに注意深くトレースした。ラジアル収縮モデルおよび完全な左心室円周にわたる22.5度の間隔でのマスの定められた拡張期中心を用いて定量分析を行った。

【0081】後部乳頭筋の中心点を定められた解剖基準として選択し、135度と命名した。22.5度のセクターのそれぞれについて壁の肥大を下記式により計算した:

(度) は遮断又は再灌流マップと95%耐性下限との間の切片において測定した。機能不全の程度 (面積単位) は95%耐性下限の下方の測定面積である。

【0082】局所的な心筋性血流を、左心房に注射されるトレーサーで表にした中心体 (直径15μm, Mew Englan



d Nuclear)を用いる参照採血法により評価した。中心体を注射の前に超音波処理して巡回攪拌した。中心体は遮断の前、遮断の110分後、再灌流の5分後および再灌流の4時間後に6種の利用可能なアイソトープ( $^{45}\text{Ca}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{113}\text{Sn}$ ,  $^{103}\text{Ru}$ ,  $^{95}\text{Nb}$ ,  $^{46}\text{Sc}$ )の1つと共に注射した。同時参照動脈サンプルを頸動脈および大腿動脈からHarvard採血ポンプを用いて7ml/分の一定速度で、中心体注射の10秒前から始めて注射完了の120秒まで連続して採血した。

【0083】超音波心臓検査の短軸スライスに対応する中部乳頭筋レベルにおける2つの隣接する左心室横スライスを、血流測定のために選択した。各スライスを16個の全厚22.5度セクターに分割した。次いで各セクターをさらに心外膜、中央心筋および心内膜サンプルに分割した。次いでこれらの組織サンプルを秤量し、カウンティングバイアル中に入れ、ガンマシンチレーションカウンターで放射活性についてアッセイした。バックグラウンドおよびオーバーラップ補ののち、絶対心筋血流を次式により計算した。

$$【0084】Q_m = (C_m \times Q_r) / C_r$$

式中、 $Q_m$  = 心筋血流 (ml/分) ;  $C_m$  = 組織サンプルのカウント/分 ;  $Q_r$  = 参照動脈サンプルの採血速度 (ml/分) ;  $C_r$  = 参照動脈サンプルのカウント/分。

心筋血流は各サンプルについて組織1g当りで表わされる。殺す直前に左回旋冠動脈を簡単に遮断し、モノストラルブルー色素 (0.5 ml/kg) を危険状態におけるインビボ心筋面積を表わすために左動脈に注射した。次いで動物にヘパリン3000Uを与え、飽和KCI溶液の静脈ポールラスにより殺し、心臓を摘出した。

処置群：犬をランダムに2群のうちの1つに割当てた。試験群において、犬に虚血が始まる直前にIL-1ra 3.0mgのポールラス注射および実験が終了するまで1時間毎にIL-1raインヒビター15mgを与えた。対照動物には、試験群に用いたと同じ緩衝液に溶解した同量のエンドトキシン不含ヒトアルブミンを与えた。

梗塞の大きさ：死亡したのち、各犬の心臓を摘出し、左心室を周囲の組織から分離し、フリーザー中で15分間冷却し、次いで5mmの横断切片にスライスした。次いでこれらのスライスを秤量し、緩衝トリフェニルテトラゾリウムクロリドの温浴中に10分間入れた。この技術において、生存能力のある組織は赤く染まるが生存能力のない組織は染まらないままである (Am.Heart. J. 101: 593)。

梗塞した組織の非染色領域を透明オーバーレイにアウトラインを描き、マイクロコンピュータを用いる面積測定により定量し、心臓スライスの重量に関して補正した。梗塞の大きさは危険状態における心筋の面積の%として表わされる (梗塞の危険状態における面積はモノストラルブルーを左動脈に注射したのちに染色されなかった左心筋の面積とする)。

心臓浮腫のNMR分析：固定したのち、心臓を約5mm厚

さの5~7個の横断切片に切断した。非虚血領域 (モノストラルブルー染色陽性) および中央の虚血領域 (ブルー染色陰性) から2個の壁貫通心筋組織サンプルが得られた。各サンプルについて心外膜を摘出し、あらゆる脂質シグナル干渉を除いた。各片をさらに壁貫通して分割し (それぞれ約500mgの重量)、その一部を乾燥技術により $\text{H}_2\text{O}$ の%について評価し (湿潤重量-乾燥重量/湿潤重量)、他の部分は清潔な乾燥したガラス管中に入れた。IBM PC-20 Minispec分光光度計 (IBM Instruments, Inc., Danbury, CT) により20MHz および40°Cで操作してT1およびT2弛緩を得た。マグネットにおけるサンプルの位置、90° および180° ラジオ周波数パルス並びにディテクターフェーズは弛緩量を得る前に各サンプルについて最適化した。T1値は20の反転データ回復点の適合によって決定した一方、T2値はCarr, Purcell, Meiboom-Gill (CPMG) シーケンスを用いて決定した。

拡散作用および種々雑多な系の不安定性を最小限にしようとして、180° ラジオ周波数インターパルスの間隔を180ミリ秒に保った。測定されたエコーサンプルの

フラクションを変数として用いてCPMG実験の期間を調整した。典型的には、エコートレインがその最初の犬

きさの15%~25%に遅延する間に1~150のデータポイント

ントを得た。T2値は多指数適合を用いて決定した。統計

計学的分析には指数適合の主要成分だけを用いた。T1

およびT2分析の結果はNMR技術の精度を確かめるた

めに隣接組織サンプルの水%により補正した。組織学的および形態学的評価：各試験群について少なく

とも3匹の動物を光学鏡検法により評価した。各心臓が

らのヘマトキシリンおよびエオジンで染色された切片を

生存能力のある組織と梗塞組織との間の範囲内の好中球

の蓄積について評価した。

統計学的分析：すべてのデータは平均+標準偏差として

て表わした。2通りの分散分析により群内の比較を行っ

た。有意F値が得られた場合には、対tテスト (Bonferroni不等調整との複数の比較について補正される) を用

いて決定し、その測定値は互いに有意に相違する。

【0085】群間比較は非対tテストにより行った。指

数回帰を用いて梗塞データを心筋血流に相関させた。遮

断-再灌流損傷からの犬心筋の保護に関するIL-1ra

処置療法の結果を後記の表10に示す。左心室体積の%と

して、処置群における流入梗塞の大きさは、対照動物に

おける18.2%に対して10.3%に減少した。これは梗塞し

た左心室体積の%において40%の減少を表わす。これと

対比して危険状態における%は著しくは変化せず、処置

群における左心室体積の40.5%に対して対照動物におい

ては44.8%であった。梗塞面積を危険状態における全面

積の%として計算する場合には、その数値は同様にIL

-1ra処置動物に有利で24.9%であるのに対して、対照

群では42%である。

【0086】

【表1】

IL-1 $\beta$ 誘導ウシ鼻軟骨の退化に及ぼす組み換えIL-1 $\alpha$ の作用すべての場合〔IL-1 $\beta$ 〕=5 ng/ml

[IL-1 $\alpha$ ]	[IL-1 $\alpha$ ]	倍刺激	
		期間II/期間I(+/-標準偏差)	
0		4.02	+/-1.7
5ng/ml	1	2.4	+/-0.47
10ng/ml	2	1.7	+/-0.4
25ng/ml	5	1.3	+/-0.4
50ng/ml	10	1.0	+/-0.2
150ng/ml	30	1.1	+/-0.2

【0087】

【表2】

29

30

免疫化第26-47日目の個々の臨床評点

3101-00-01

免疫化後の日数

	24	26	31	32	33	35	36	39	40	42	45	47
ブラシーボ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

足合計  
総得点

ril-lra

【表3】

足合計  
総得点

【0088】

31  
実施例3のプロトコルに従ってSCWを注射し、ついでIL-1ra  
または食塩水で処置したラットの足くるぶし関節直径

日 目	関節直径 (mm) (± SD)							
	SWC注射関節				食塩水注射関節			
	IL-1ra	SD	食塩水	SD	IL-1ra	SD	食塩水	SD
0	5.96	.12	6.02	.10	5.95	.17	5.96	.16
1	7.95	.33	7.73	.36	5.94	.15	5.94	.13
2	7.44	.28	7.42	.27	5.98	.11	5.95	.17
3	7.20	.39	7.23	.27	6.00	.12	6.01	.07
6	6.78	.27	6.64	.29	6.06	.09	6.06	.13
10	6.58	.34	6.63	.18	6.00	.12	5.85	.16
14	6.44	.21	6.36	.17	5.99	.08	5.90	.17
20	6.46	.18	6.52	.14	5.91	.11	5.87	.20
21	7.34	.36	7.78	.31	5.73	.18	5.78	.12
22	8.31	.58	8.70	.43	5.85	.16	5.96	.22
23	8.55	.81	9.06	.42	6.02	.19	5.99	.16
24	8.23	.71	8.56	.39	6.03	.13	5.94	.20
25	8.00	.56	8.16	.43	6.05	.12	6.06	.17
28	7.48	.40	7.71	.30	6.04	.13	5.98	.13

【0089】

\* \* [表4]

関節炎症のSCW再活性化に続く関節組織病状に及ぼすIL-1raの作用  
(第20～23日目に毎日1mg/kg 4回)

病状	ブラシーボ群		IL-1ra 群		P
	陽性/12	評点	陽性/12	評点	
軟骨腐食	10	1.0 ± .6	3	0.25 ± .45	.0023
骨腐食	3	0.25 ± .45	2	0.17 ± .39	NS
滑液のう炎	11	0.92 ± .29	3	0.25 ± .45	.0003
骨膜炎	9	0.75 ± .45	12	0.25 ± .45	.013
滑膜炎	12	2.21 ± .84	12	1.08 ± .47	.00052
PMN	12	1.0	12	1.0	NS

【0090】

【表5】

ラットでのSCW-誘発全腸炎に及ぼすIL-1raの作用

	腸癒着	盲腸結節	肝臓重量 (gm)	WBC
IL-1ra	1.7	1.8	16.9	49.8
PBS	2.2	2.4	18.6	57.7
群間比較の ためのp値	0.14	0.10	0.19	0.13

【0091】

＊ ＊【表6】

ラットにおけるSCW-誘発全腸炎に及ぼすIL-1raの作用

	腸癒着	盲腸結節	肝臓重量 (gm)	WBC
IL-1ra	1.4	1.7	13.3	35.1
PBS	2.2	2.3	14.1	35.8
群間比較の ためのp値	0.017	0.077	0.23	0.43

【0092】

＊ ＊【表7】

ラットにおけるSCW-誘発全腸炎に及ぼすIL-1raの作用

	腸癒着	盲腸結節	肝臓重量 (gm)	WBC
IL-1ra	0.8	0.9	0.047	10.7
PBS	1.8	1.0	0.049	10.3
群間比較の ためのP値	0.07	0.30	0.24	0.31

【0093】

【表8】

ラットにおけるインドメタシン-誘発腸損傷に及ぼすIL-1ra処理の効果

処 理	死	腸 の 症 状					全 身 症 状			
		潰 瘍		癒 着	腸の肥厚化	MPO u/g	HCT %	Hgb (g/dl)	WBC ( $10^3/\mu$ l)	
		#	面積%							
食塩水	0/9	0	0	0/9	0/9	0.005 (0.01)	42	15	8	
IL-1ra	0/10	0	0	0/10	0/10	0.01 (0.1)	41	14	8	
インドメタシン	2/9	1.3 ( $\pm 0.6$ )	7.1 ( $\pm 2.7$ )	2/7	4/7	0.06 (0.2)	37	13.5	11	
インドメタシン + IL-1ra	0/8	0.8 ( $\pm 0.4$ )	2.8 ( $\pm 1.9$ )	3/8	2/8	0.03 (0.2)	40	14	11	

【表9】

【0094】



ウサギにおける実験的エンドトキシン誘発ショック：生存率に及ぼすIL-1raの効果

	生存 (no)					生存率 7日 (%)
	12h	24h	36h	48h	7d	
A (N=5)	5	5	5	5	5	100
B (N=10)	9	6	3	2	2	20
C (N=10)	9	7	4	3	2	20
D (N=10)	10	7	6	5	4	40
E (N=10)	10	10	10	9	9	90

【0095】

\* \* 【表10】

犬冠遮断-再灌流研究での梗塞組織の程度の減少における

IL-1raの作用

IL-1ra処置 (n=9)

左心室体積の%としての  
梗塞の大きさ

10.3% - + 2.2%

左心室体積の%としての  
危険状態における面積

40.5% - + 1.7%

危険状態における体積の  
%としての梗塞の大きさ

24.9% - + 4.6%

アルブミン処置 (n=9)

左心室体積の%としての  
梗塞の大きさ

18.2% - + 3.3%

左心室体積の%としての  
危険状態における面積

44.8% - + 1.9%

危険状態における体積の  
%としての梗塞の大きさ

42% - + 8.3%

【0096】本発明を好ましい態様に関して記載したが、当業者が本発明の範囲および精神から離れることなく修正および変更を行なうことは言うまでもない。従って、好ましい態様の上記の記載は限定の意味と理解すべきでなく、本発明は特許請求の範囲に記載の請求項およびそれらの均等によって最も良く特定されるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は漸増量のIL-1Bに応答する、ウシ鼻

軟骨からのグリコサミノグリカン (GAG) の放出を示す。

【図2】図2はウシ鼻軟骨からの、IL-1B誘導GAG放出に及ぼす漸増量のIL-1raの阻害作用を示す。

【図3】図3はマウスにおけるタイプIIコラーゲン誘導関節炎の発病に及ぼすIL-1raの阻害作用を示す。

【図4】図4はマウスにおけるタイプIIコラーゲン誘導関節炎の発病に及ぼすIL-1raの阻害作用を示す。

【図5】図5はラットにおけるSCW誘導関節炎のSC

W再活性化に及ぼすIL-1raの阻害作用を示す。

【図6】図6はインターロイキン-1媒介IBDの種々の症状に及ぼすIL-1raの治療効果を示す。

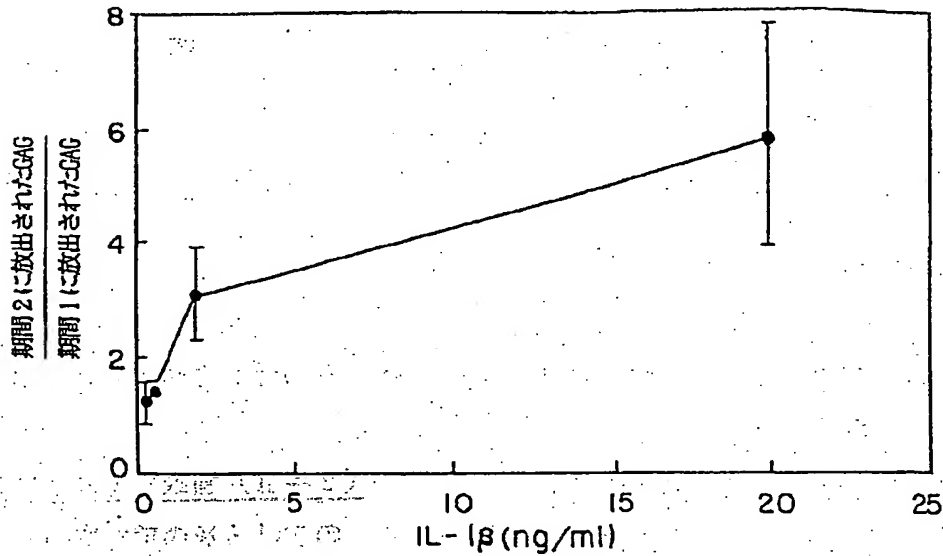
【図7】図7はインドメタシンと一緒に、関節炎症のP\*

\*G-APS再活性化に及ぼすIL-1raの作用を示す。

【図8】図8はエンドトキシン誘導ショックでのウサギの生存率に及ぼすIL-1raの作用を示す。

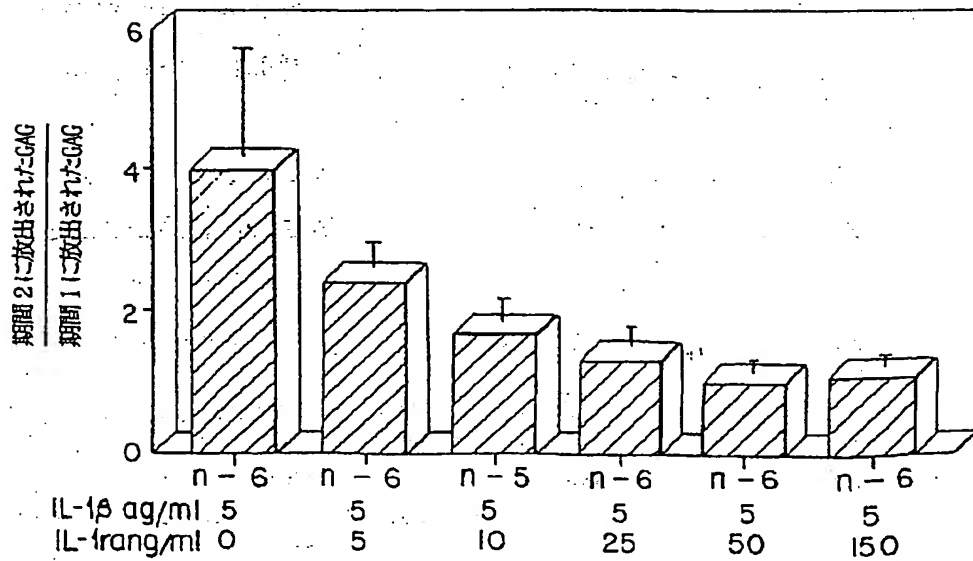
【図1】

IL-1β用量応答曲線



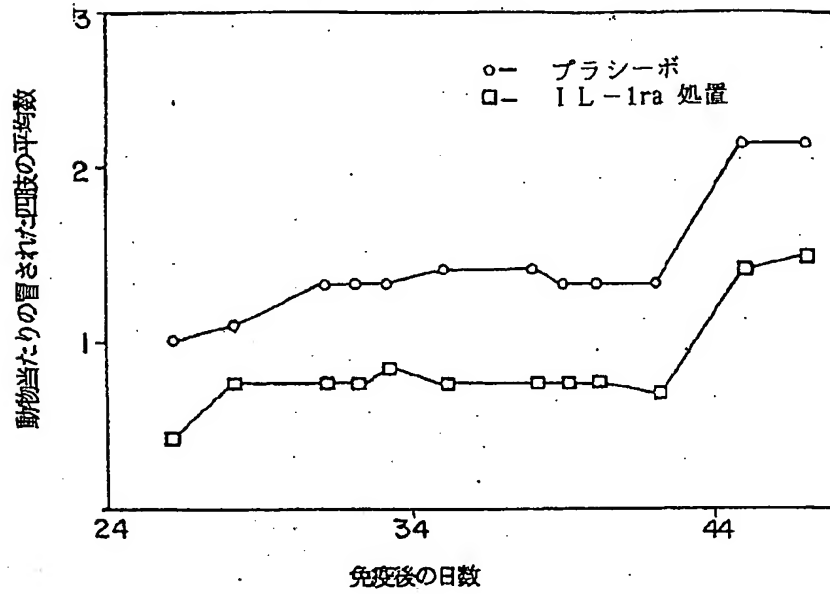
【図2】

IL-1β誘導ウシ軟骨の退化に及ぼす組み換えIL-1raの作用



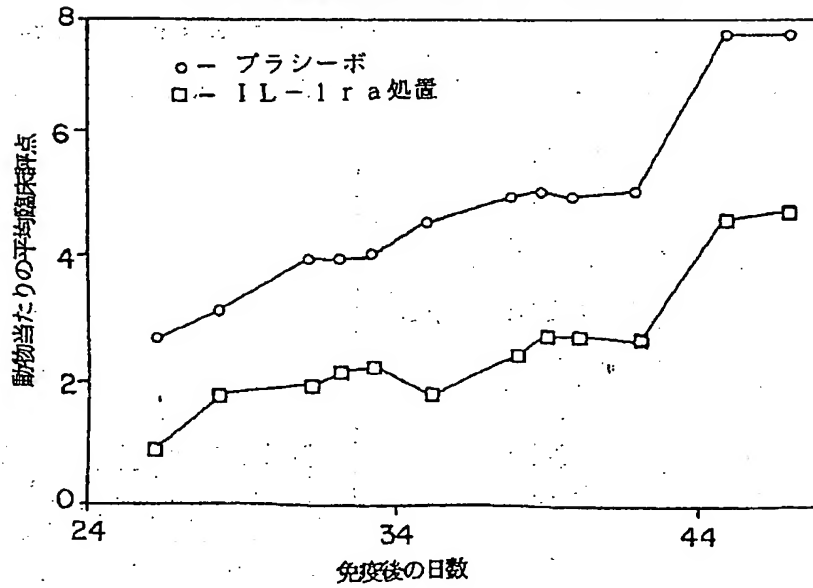
【図3】

コラーゲン誘導関節炎に及ぼすIL-1raの作用

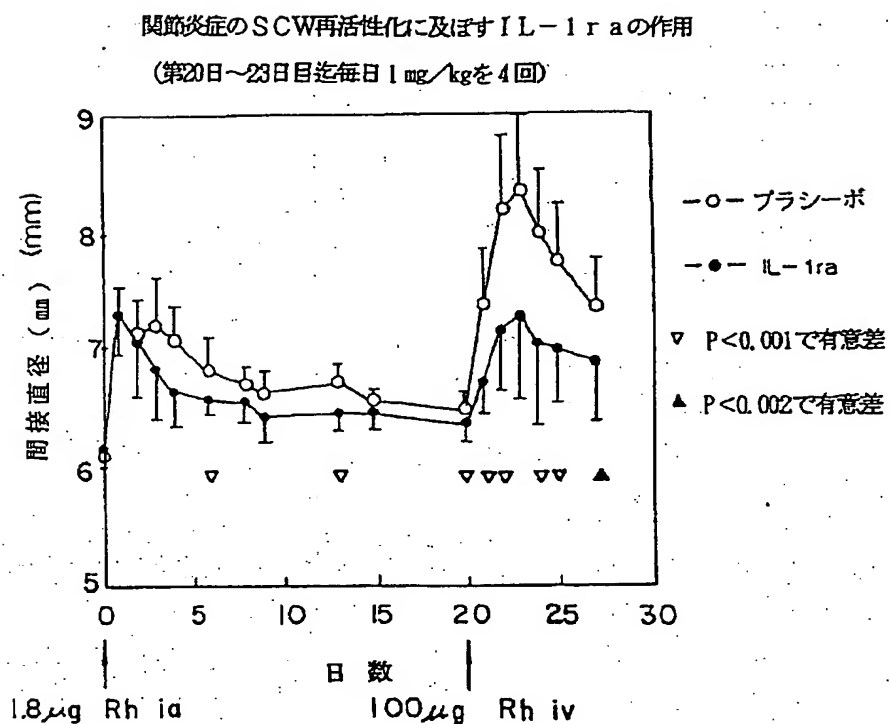


【図4】

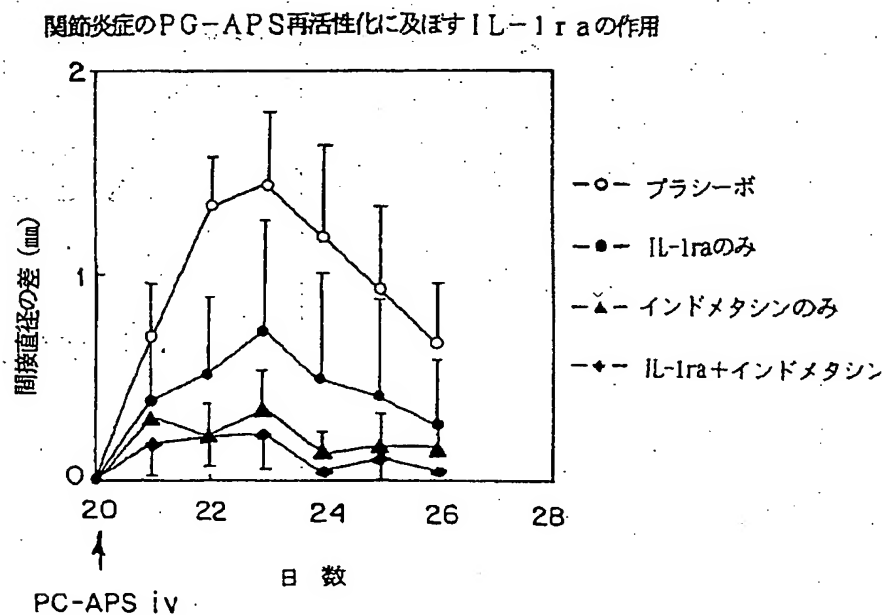
コラーゲン誘導関節炎に及ぼすIL-1raの作用



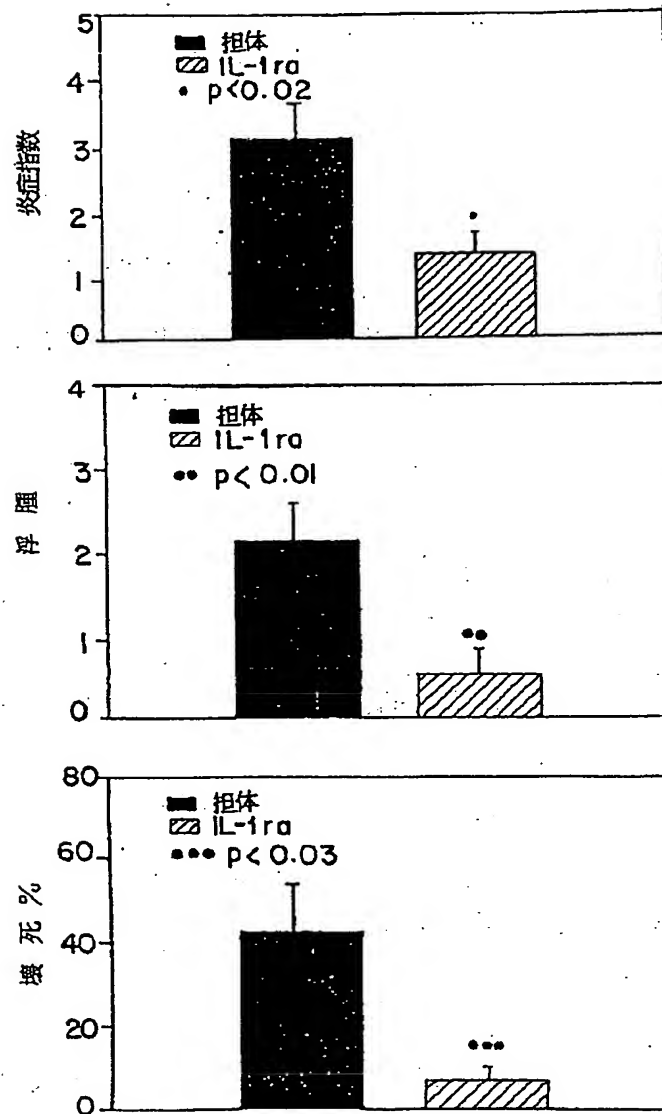
【図5】



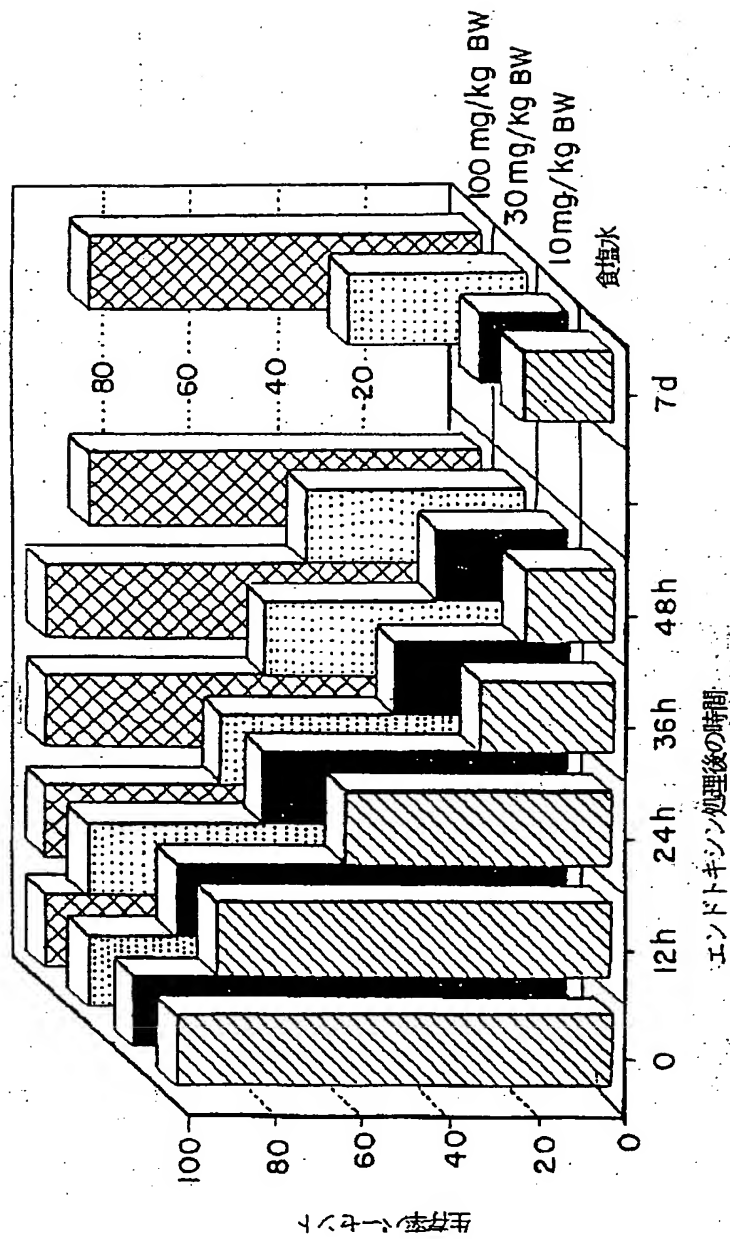
【図7】



【図6】



〔図8〕



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
A61K 37/02

識別記号  
ADP  
ADV

庁内整理番号

F I

技術表示箇所



(72)発明者 スミス, クリストファー, ジー,  
アメリカ合衆国 コロラド州 80025,  
エルドラド スプリングス, バルドウイ  
ン サークル 67

(72)発明者 トンプソン, ロバート, シー,  
アメリカ合衆国 コロラド州 80303,  
ボウルダー, ルハイ ストリート 1820

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第3部門第2区分  
 【発行日】平成6年(1994)2月15日

【公開番号】特開平5-112462  
 【公開日】平成5年(1993)5月7日  
 【年通号数】公開特許公報5-1125  
 【出願番号】特願平3-68640  
 【国際特許分類第5版】

A61K 37/02 ABE 8314-4C  
 ABJ  
 ABN  
 ACD  
 ACJ  
 ADP  
 ADV

【手続補正書】

【提出日】平成5年4月20日

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】有効成分として少なくとも1種のインターロイキン-1インヒビターを含有する、インターロイキン-1により媒介された疾患を治療するための医薬組成物。

【請求項2】前記インターロイキン-1インヒビターがタンパク質である請求項1記載の組成物。

【請求項3】前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1raである請求項1記載の組成物。

【請求項4】前記IL-1raがIL-1raa, IL-1raB, IL-1raXおよびメチオニルIL-1raから成る群より選ばれる少なくとも1種の化合物である請求項3記載の組成物。

【請求項5】前記IL-1raがIL-1raaである請求項4記載の組成物。

【請求項6】前記IL-1raがIL-1raBである請求項4記載の組成物。

【請求項7】前記IL-1raがIL-1raXである請求項4記載の組成物。

【請求項8】前記IL-1raがメチオニルIL-1raである請求項4記載の組成物。

【請求項9】前記IL-1raが組換えDNA法により製造されたものである請求項4記載の組成物。

【請求項10】前記IL-1raが実質的に純粋な形態で製造されたものである請求項9記載の組成物。

【請求項11】前記組成物が製剤上許容しうる担体中に

IL-1インヒビターを含む請求項1記載の組成物。

【請求項12】前記組成物が液体の剤形である請求項1記載の組成物。

【請求項13】前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1結合性タンパク質である請求項1記載の組成物。

【請求項14】前記IL-1結合性タンパク質が可溶性レセプターである請求項13記載の組成物。

【請求項15】前記IL-1結合性タンパク質がモノクローナル抗体である請求項13記載の組成物。

【請求項16】前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1の生産を阻止するものである請求項1記載の組成物。

【請求項17】IL-1の生産を阻止する前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1raである請求項16記載の組成物。

【請求項18】前記インターロイキン-1により媒介される疾患が関節炎、炎症性腸疾患、敗血症性ショック、虚血性損傷、再灌流損傷、骨粗鬆症、喘息、インシュリン糖尿病、骨髄性および他の白血病、乾癬および悪液質/食欲不振から成る群より選ばれるものである請求項1記載の組成物。

【請求項19】有効成分として少なくとも1種のインターロイキン-1インヒビターを含有する、インターロイキン-1により媒介される疾患を予防するための医薬組成物。

【請求項20】前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1raである請求項19記載の組成物。

【請求項21】前記IL-1raがIL-1raa, IL-1raBおよびIL-1raXから成る群より選ばれる請求項20記載の組成物。

【請求項22】前記インターロイキン-1インヒビター

がIL-1結合性タンパク質である請求項19記載の組成物。

【請求項23】 前記IL-1結合性タンパク質が可溶性レセプターである請求項22記載の組成物。

【請求項24】 前記IL-1結合性タンパク質がモノクローナル抗体である請求項22記載の組成物。

【請求項25】 前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1の生産を阻止するものである請求項19記載の組成物。

【請求項26】 IL-1の生産を阻止する前記インターロイキン-1インヒビターがIL-1raである請求項25記載の組成物。

【請求項27】 前記インターロイキン-1により媒介される疾患が関節炎、炎症性腸疾患、敗血症性ショック、虚血性損傷、再灌流損傷、骨粗鬆症、喘息、インシュリン糖尿病、骨髓性および他の白血病、乾癬および悪液質／食欲不良から成る群より選ばれるものである請求項19記載の組成物。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正内容】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は種々の疾患および医学的状態の治療のための医薬組成物に関する。本明細書記載の医薬組成物による治療に適する疾患および医学的状態の共通の要素はインターロイキン-1の関与である。本発明はインターロイキン-1により媒介された疾患および医学的状態の治療のための医薬組成物に関する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正内容】

【0014】また、ヒトIL-1はウサギにショック様状態を引き起こすことも示されている。ヒトのIL-1 $\beta$ を1回ボーラス注射すると血圧低下、および敗血症性ショックに特徴的な幾つかの血行力学的および血液学的なパラメーターがもたらされた。例えば、IL-1を注射したウサギのMAPは最小で19.1%低下した。Okusawa等、J. Clin. Invest., 81, 第1162-1171頁(1988)。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正内容】

【0021】

【課題を解決するための手段】発明の要約本発明はインターロイキン-1により媒介される疾患を治療するため

の医薬組成物について記載する。本発明の目的は、それを必要とする患者に治療剤を投与することによる、インターロイキン-1媒介関節炎、インターロイキン-1媒介炎症性腸疾患(「IBD」)、インターロイキン-1媒介敗血症性ショック、インターロイキン-1媒介虚血性損傷およびインターロイキン-1媒介再灌流損傷を治療するための医薬組成物を提供することである。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正内容】

【0022】本発明の付加的な目的および利点は、一部は以下の明細書中に記載されており、一部はこの記載から明らかとなるかまたは本発明の実施より知ることができよう。これら目的および利点は特に添付の特許請求の範囲およびその組み合わせによって実現および達成できる。本発明の目的に従って、その目的を達成するために、インターロイキン-1媒介関節炎、インターロイキン-1媒介炎症性腸疾患、インターロイキン-1媒介敗血症性ショック、インターロイキン-1媒介虚血性損傷およびインターロイキン-1媒介再灌流損傷を含む、インターロイキン-1により媒介された疾患を治療するための医薬組成物が開示される。これらの組成物は、治療上有効な量のインターロイキン-1インヒビターを含有する。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正内容】

【0027】上述したとおり、本発明はインターロイキン-1媒介関節炎、インターロイキン-1媒介炎症性腸疾患、インターロイキン-1媒介敗血症性ショック、インターロイキン-1媒介虚血性損傷およびインターロイキン-1媒介再灌流損傷を含むインターロイキン-1媒介疾患を治療するための医薬組成物に関する。この組成物は治療上有効な量のインターロイキン-1インヒビターを含有する。一態様においては、本発明の好ましいインターロイキン-1インヒビターはIL-1レセプターの拮抗体(IL-1ra)として作用する天然に存在するタンパク質である。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正内容】

【0038】好ましいインヒビターの阻害機能は1またはそれ以上の別個の分離しうる部分により付与されることが可能であるから、本発明の組成物は、その活性成分

としてインターロイキン-1の阻害を制御するインヒビターの一部を含むように処方され得ることも想定される。本発明の治療用組成物は、動脈内注射、吸入ミスト、経口活性製剤または坐剤のような他の有効な投与形態も想定されるが、注射による非経口投与が好ましい。好ましい担体の一つは生理食塩溶液であるが、他の製剤上の許容しうる担体も使用しうることを意図される。好ましい態様の一つにおいては、担体とIL-1raが生理学的に適合する徐放性製剤を構成することも想定される。かかる担体における主要な溶媒は水または本質的に非水性のもののいずれかである。加えて、担体は製剤のpH、浸透性、粘度、透明度、色、滅菌性、安定性、溶解速度または香りを修飾または維持するための他の薬理学的に許容しうる付形剤をも含有し得る。同様に、担体はさらに、IL-1raの安定性、溶解速度、放出または吸収を修飾または維持するための他の薬理学的に許容しうる付形剤をも含有しうる。かかる付形剤は、一回量または複数回量の形態における非経口投与用薬量を製剤化するのに通常一般的に使用される物質である。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正内容】

【0039】治療用組成物が製剤化されると、これは溶液、懸濁液、ゲル、乳濁液、固体または脱水もしくは凍結乾燥粉末として滅菌バイアル中に貯蔵できる。かかる製剤はすぐ使用しうる形態で、または投与直前に再構成を必要とする形態のいずれかで貯蔵しうる。かかる製剤の好ましい貯蔵は、少なくとも4℃以下、好ましくは-70℃の温度でなされる。IL-1raを含有するかかる製剤はまた、生理学的pHまたはその付近で貯蔵され投与されるのが好ましい。高pH（即ち、8より大きい）または低pH（即ち、5より小さい）での製剤の貯蔵および投与は望ましいことではないと現在考えられている。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正内容】

【0044】インターロイキン-1媒介敗血症性ショックの治療に好ましいもう一つの様式においては、最初にIL-1raがボラス注射され、続いて循環IL-1レベルがもはや上昇しなくなる迄、IL-1raが連続的に注入される。治療の目的は血清IL-1raレベルをこの

期間中2~20μg/mlに維持することである。この様式の好ましい態様においては、最初に患者の体重1kg当たり約10~20mgのIL-1raをボラス投与し、続いて患者体重1kg当たり毎分約5~20μgのIL-1raを循環IL-1レベルがそれ以上増大しなくなる迄連続的投与する。血清IL-1bレベルは市販で入手しうるイムノアッセイ試験キットにより確認できる。IL-1媒介敗血症性ショックの治療の開始は治療のいずれの様式においても、敗血症または敗血症の可能性が診断されたら可能な限り速やかに開始しなければならない。例えば、治療は敗血症性ショックを生ずる危険性がある手術または事故または他の出来事の後、速やかに開始しうる。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正内容】

【0045】インターロイキン-1媒介虚血性および再灌流損傷の治療のための好ましい用量範囲は、患者の体重1kg当たり約1~50mgであり、毎時間ごとに投与される。好ましい態様においては、最初に約15~50mg/kgのIL-1raがボラス投与され、続いて約5~20mg/kgが毎時注射される。投与頻度は用いられる製剤中のIL-1raの薬動学的パラメーターの如何による。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0078

【補正方法】変更

【補正内容】

【0078】動物を1昼夜絶食させ、翌朝5%チアミールナトリウム10ml、次いで6%ナトリウムペントバルビタール2mlの静脈内注射により麻酔した。必要に応じ追加のナトリウムペントバルビタールを実験中に投与した。Harvard レスビレーターにより人工呼吸を維持した。第5肋骨内腔を通して左開胸を行い、液体および薬物投与のために左内側頸静脈中に、そして血圧をモニターし標準血液サンプルを採血するために左内側頸動脈および大腿動脈中にポリビニルカテーテルを配置した。放射性小球を注射するために左心房に1本のカテーテルを配置した。左回旋動脈を切開して周囲の組織を除去し、電磁流プローブをこの血管上に第1鈍角境界ブランチの近位に置いた。リドカイン50mgを静脈内ボラス注射したのち、回旋冠動脈を係蹄遮断子で2時間遮断した。電磁流プローブにより完全な遮断を確かめた。次いで係蹄を突然にゆるめ、冠血管床の再灌流を4時間行わせた。